

**Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L,
BAFF, IL10 und IL21 auf Proliferation, Überleben
und Phänotypänderungen von B-Zellen des
Haushuhns *in vitro***

von

Larissa Postrak

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L,
BAFF, IL10 und IL21 auf Proliferation, Überleben
und Phänotypänderungen von B-Zellen des
Haushuhns *in vitro***

von

Larissa Postrak

aus

Freiburg im Breisgau

München, 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von

Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sonja Härtle

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Maik Dahlhoff

Tag der Promotion: 29.07.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	2
2.1	B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus.....	2
2.1.1	Von der hämatopoetischen Vorläuferzelle zur B-Zelle	3
2.1.2	B-Zellreifung in der Peripherie	4
2.1.2.1	Plasmazellen.....	5
2.1.2.2	B-Gedächtniszellen	6
2.2	B-Zellentwicklung im Huhn	7
2.2.1	Präbursale und bursale Phase der B-Zellentwicklung beim Huhn.....	8
2.2.2	Postbursale B-Zellentwicklung beim Huhn	9
2.2.2.1	Germinalre Zentren im Huhn	11
2.2.2.2	Plasmazellen im Huhn	11
2.2.2.3	B-Gedächtniszellen im Huhn	12
2.3	Auf B-Zellen einwirkende Zytokine	12
2.3.1	Tumornekrosefaktor-Familienmitglieder	13
2.3.1.1	CD40L.....	13
2.3.1.2	CD40L im Huhn.....	15
2.3.1.3	BAFF.....	15
2.3.1.4	BAFF im Huhn.....	16
2.3.2	Interleukin 10	17
2.3.3	Interleukin 10 im Huhn	18
2.3.4	Interleukin 21	19
2.3.5	Interleukin 21 beim Huhn	21
3	ZIELSETZUNG	22
4	MATERIAL UND METHODEN	23
4.1	HÜHNERHALTUNG.....	23
4.2	GEWINNUNG VON PRIMÄREN HÜHNERLEUKOZYTEN	23
4.2.1	Gewinnung von Leukozyten aus Blut	24
4.2.2	Gewinnung von Leukozyten aus Bursa und Milz	24
4.2.3	Mikroskopische Beurteilung der Leukozyten	25
4.3	ZELLKULTUR.....	25
4.3.1	Medien und Zusätze	25
4.3.2	Verwendete Zelllinien.....	26
4.3.3	Kultivierung von Zelllinien.....	26
4.3.4	Kultivierung von primären Zellen.....	26
4.3.5	Einfrieren von Zellen	27
4.3.6	Auftauen von Zellen.....	27
4.4	Herstellung der rekombinanten Zytokine	27
4.4.1	Transiente Transfektion von 293-T Zellen mit IL21	27

4.4.2	Gewinnung der Zytokine aus dem Überstand stabil transfizierter Zelllinien	28
4.4.3	Konzentrierung der rekombinanten Zytokine	28
4.4.4	Nachweis der rekombinanten Zytokine im ELISA	29
4.4.4.1	Tabellarische Durchführung der spezifischen ELISA	31
4.4.5	Nachweis von IL21 im Proliferationsassay mit [³ H]-Thymidin	32
4.5	Proliferationsassay mit [³H]-Thymidin	33
4.6	Durchflusszytometrische Untersuchungen	34
4.6.1	Primäre Antikörper	35
4.6.2	Sekundäre Antikörper	35
4.6.3	Indirekte Färbungen	35
4.6.4	Direkte Färbungen mit Fluochrom-markierten Antikörpern	36
4.6.5	Lebend/Tot-Färbung	36
4.6.6	Mehrfachfärbungen mit Antikörpern des gleichen Isotyops.....	36
4.6.7	Färbung der Milzleukozyten mit dem Proliferationsfarbstoff eFluor670	37
4.6.8	Zellzahl-Quantifizierung mittels Beads	38
4.7	Statistische Auswertung.....	38
5	ERGEBNISSE	39
5.1	Einfluss von CD40L, BAFF, IL10 und IL21 auf die Lymphozytenzahl	39
5.2	Einfluss von CD40L, BAFF, IL10 und IL21 auf die Proliferation von Lymphozyten.....	42
5.2.1	Lymphozytenproliferation im [³ H]-Thymidin-Assay	43
5.2.1.1	Einfluss von BAFF, IL10, IL21 auf die Proliferation	43
5.2.1.2	Einfluss der Zugabe von CD40L auf die Proliferation	44
5.2.1.3	Effektstärke der Zytokine auf die Proliferation	45
5.2.2	Lymphozytenproliferation im Prolifertaionsassay mit eFluor670	46
5.2.2.1	Charakterisierung Zytokin-stimulierten proliferierenden Milzlymphozyten.....	47
5.2.2.2	B- und T (CD4 ⁺ oder CD8 ⁺)-Zellfrequenz in den mit CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimulierten Milzzellkulturen	47
5.2.2.3	Identifizierung der proliferierenden Zellpopulationen.....	49
5.2.2.4	Anteil proliferierender B-Zellen an der gesamten B-Zellpopulation.....	51
5.3	Vergleich der Effektstärke der Zytokine auf Erhöhung der Zellzahl und Proliferation	52
5.4	Phänotypische Charakterisierung stimulierter B-Zellkulturen	54
5.4.1	Expression von Oberflächenmarkern auf Hühner-B-Zellen	55
5.4.1.1	Bu1	60
5.4.1.2	BAFF-R.....	60
5.4.1.3	Leichte-Kette.....	61
5.4.1.4	CD40	61
5.4.1.5	CXCR4.....	62
5.4.1.6	CXCR5.....	62
5.4.1.7	MHCII.....	63
5.4.1.8	CD80	63
5.4.2	Am Rezeptor haftende Liganden	65

6	DISKUSSION	66
6.1	Einfluss von CD40L, BAFF, IL10 und IL21 auf die Lymphozytenzahl nach Kultivierungszeit.....	67
6.2	Proliferation.....	68
6.3	Zytokin-induzierte Phänotypänderung.....	71
6.3.1	Expression von B-Zellmarkern stimulierter B-Lymphozyten	71
6.3.2	CD40	73
6.3.3	Aktivierungsmarker	74
6.3.3.1	MHCII	74
6.3.3.2	CD80	75
6.3.4	Chemokinrezeptoren	77
6.3.4.1	CXCR4.....	77
6.3.4.2	CXCR5.....	78
6.3.5	Ausblick	79
7	ZUSAMMENFASSUNG	81
8	SUMMARY	83
9	LITERATURVERZEICHNIS	85
10	ANHANG.....	98
11	DANKSAGUNG.....	101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Überblick der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus	2
Abbildung 2: Embryonale Besiedelung der Bursa und Auswanderung der B-Zellen nach dem Schlupf	8
Abbildung 3: B-Zellentwicklung vergleichend Maus, Mensch / Huhn	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung der B-Zellaktivierung	14
Abbildung 5: Einfluss von IL21 auf die Differenzierung von B-Zellen	19
Abbildung 6: Absolute Anzahl lebender B-Zellen in mit CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimulierten Bursa- und Milzzellkulturen	40
Abbildung 7: Durch BAFF, IL10 und IL21 induzierte Proliferation	43
Abbildung 8: Einfluss der Zytokinkombinationen mit CD40L auf die Proliferation von Lymphozyten.....	44
Abbildung 9: Gatingstrategie zur Bestimmung der B- und T-Zellfrequenz in stimulierten Milzlymphozyten	47
Abbildung 10: Gatingstrategie zur Bestimmung der B- und T-Zellfrequenz der <i>eFluor_{low}</i> Zellpopulation	49
Abbildung 11: Gatingstrategie zur Bestimmung des proliferierenden B-Zellanteil an der gesamten B-Zellpopulation	51
Abbildung 12: Anteil proliferierender B-Zellen an gesamter B-Zellpopulation.....	51
Abbildung 13: Proliferationsindex und Lebend-Tot-Index in Bursa- und Milzzellkulturen ...	53
Abbildung 14: Gatingstrategie der phänotypischen Charakterisierung stimulierter B-Zellen.	55
Abbildung 15: Durchflusszytomtrische Phänotypisierung der stimulierten Bursa- und Milzleukozyten.....	58
Abbildung 16: Oberflächenfärbung von CD40L und BAFF und zugehörigen Rezeptoren auf Lymphozyten.....	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Oberflächenmoleküle zur Identifikation von B-Zell-Subtypen	7
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien	26
Tabelle 3: Übersicht der im ELISA verwendeten Antikörper.....	30
Tabelle 4: Durchführung CD40L-ELISA	31
Tabelle 5: Durchführung BAFF-ELISA	32
Tabelle 6: Durchführung IL10-ELISA.....	32
Tabelle 7: In der Durchflusszytometrie eingesetzte primäre Antikörper	35
Tabelle 8: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper	35
Tabelle 9: Durchflusszytometrisch verwendete direktkonjugierte Antikörper	36
Tabelle 10: Lebend-Tot-Index der in kultivierte Lymphozyten aus Bursa und Milz	41
Tabelle 11: Proliferationsindex der stimulierten Lymphozyten.....	45
Tabelle 12: B- und T-Zellfrequenz der Milz vor Beginn der Kultivierung	46
Tabelle 13: B- und CD4 ⁺ und CD8 ⁺ -T-Lymphozytenfrequenz nach 48 h in Milzkulturen	48
Tabelle 14: Anteil und Zusammensetzung der proliferierenden Zellen (<i>eFluor_{low}</i>) pro Stimulationsansatz.....	50
Tabelle 15: Heat Map Darstellung der Oberflächenexpression der gefärbten Marker auf stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten.....	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AID	<i>activation-induced cytidine deaminase</i>
APC	Allophycocyanin
APRIL	<i>A proliferation-inducing ligand</i>
Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAFF	<i>B cell activating factor of the tumor necrosis factor family</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl6	<i>B-cell lymphoma 6 protein</i>
BCMA	<i>B cell maturation antigen</i>
BCR	<i>B-cell receptor</i> , B-Zellrezeptor,
Blimp1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
BLyS	<i>B-lymphocyte stimulator</i>
BrdU	Bromodeoxyuridine
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40Ligand
CFSE	<i>Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester</i>
Con A	Concanavalin A
cpm	<i>counts per minute</i>
CT	Caecaltonsille
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
CXCR	Rezeptor für CXC-Chemokin
D _H	<i>Diversity</i> - Segment der schweren Kette
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid</i>
E2A	Transkriptionsfaktor
EBF	Transkriptionsfaktor
eGFP	grün fluoreszierende Protein
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EST	<i>Expressed-Sequence-Tag</i>
ET	Embryonal Tag
et al.	und andere
ex vivo	außerhalb des Lebendigen
FAS	<i>Fas death factor</i>
FBS	fötales Rinderserum, <i>fetal bovine serum</i>
FDC	follikulär dendritische Zellen
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Flag-tag	Oktapeptid als Epitop zum Nachweis
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GC-Reaktion	Germinale Zentrums Reaktion
HCl	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HEK	Humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonic kidney cells</i>
HSZ	Hämatopoetische Stammzelle
Ig	Immunglobulin
Ig-Ko	Immunglobulin-Knockout

Ig-Loci	Immunglobulin-Loci
IL	Interleukin
<i>in vivo</i>	im Lebendigen
JAK	Januskinase
J _H	<i>Joining</i> - Segment der schweren Kette
J _L	<i>Joining</i> - Segment der leichten Kette
LFA-1	<i>leucocyte function associated molecule-1</i>
L-Kette	Leichte Kette des B-Zellrezeptors
mAB	monoclonal antibody
mAK	monoklonaler Antikörper
MALT	<i>Mucosa Associated Lymphoid Tissue</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, <i>Major Histocompatibility Complex</i>
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid , Transport Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
MZA B-Zelle	Marginalzone B-Zelle
N ₂	Stickstoff
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	natürliche Killerzellen, <i>natural killer cell</i>
NO	Stickstoffmonoxid
PALS	Periarterial lymphoid Sheath
Pax5	paired box protein 5
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PELS	Polymerase-Kettenreaktion, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
POD	Peroxidase
PRDM1	<i>PR domain zinc finger protein 1 = Blimp1</i>
PWP	Periellipsoidalen weißen Pulpa
R	Rezeptor
RNA	<i>recombination-activating gene</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
STABW	Standardabweichung
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T1	<i>Transitional 1</i> , Übergangsstadium 1
T2	<i>Transitional 2</i> , Übergangsstadium 2
TACI	<i>transmembrane activator CAML interactor</i>
Th	T-Helferzelle
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFSF13B	<i>Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 13b</i>
TNFSF5	<i>Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 5</i>
V _{L/h}	Variable-Segment der leichten / schweren Kette
ZKÜ	Zellkulturüberstand
α	Alpha
γ-chain	Gamma-Kette

1 EINLEITUNG

Wichtige grundlegende Erkenntnisse der Immunologie stammen aus der Forschung an Hühnern. Das Huhn (*Gallus gallus*) entwickelte sich im letzten Jahrhundert, neben seiner weltweiten wirtschaftlichen Bedeutung als lebensmittellieferndes Tier, aufgrund der Verfügbarkeit von Inzuchtlinien und dem leichten Zugang zu Embryonalstadien zu einem wichtigen Modelltier der immunologischen Forschung [1].

Durch Transplantationsversuche mit Hühner-Embryonen fand der Pathologe James Murphy vor fast 100 Jahren heraus, dass Lymphozyten die aktive Komponente in der Transplantatabstoßung und in der Infektionsabwehr darstellen, hierbei ging er (seiner Zeit weit voraus) von einer angeborenen und erworbenen Immunantwort aus [2]. Einige Zeit später (1956) wurden durch die Experimente mit burspektomierten Hühnern von B. Glick die bursalen Lymphozyten als Antikörper produzierende Zellen erkannt [3].

B-Zellen produzieren Antikörper, welche die Effektormoleküle der humoralen Immunantwort bilden und essentiell zum Schutz gegenüber bakteriellen und viralen Erregern beitragen. Um die Gesunderhaltung in großen Geflügelbeständen zu gewährleisten, wird bereits beim Eintagsküken mit der ersten Impfung von vielen weiteren begonnen. Ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Mechanismen zur Regulation der B-Zelldifferenzierung und Antikörper-Produktion ist notwendig, um effektivere Impfstoffe entwickeln zu können.

Aufgrund einiger Unterschiede zwischen dem aviären Immunsystem und dem der Säuger ist es nur bedingt möglich Forschungsergebnisse, das B-Zellsystem von Mensch und Maus betreffend, auf die Spezies Huhn zu übertragen. Deshalb ist es notwendig, das B-Zellsystem des Huhns weiter zu charakterisieren, was bislang durch die schnelle Sterblichkeit der Lymphozyten *in vitro* sehr begrenzt wird.

Außerdem könnten mithilfe verbesserter *in vitro*-Kultursysteme für primäre Lymphozyten in Zukunft Hühner im Tierversuch eingespart werden, da mehrere Geflügel-Pathogene, beispielsweise das Virus der Marekschen Krankheit oder der infektiösen Bursitis, einen B-Zelltropismus aufweisen und so deren Erforschung *in vitro* erleichtert werden könnte.

2 LITERATURÜBERSICHT

B-Zellen sind die Effektorzellen der humoralen Immunabwehr. Sie tragen essentiell zur Beseitigung eingedrungener Pathogene bei. Auf der Zelloberfläche tragen sie ein membranständiges Immunglobulin, welches ein spezifisches Antigen erkennt und sezerniert werden kann. Die drei Hauptaufgaben der von B-Zellen sezernierten Antikörper während einer Immunantwort sind die Aktivierung von Komplement zur Rekrutierung weiterer Immunzellen, die Opsonisierung und die Neutralisation von Pathogenen. Hierdurch werden Erreger entweder für spezialisierte phagozytierende oder zytotoxische Immunzellen markiert oder direkt vernichtet.

Aufgrund der Unterschiede in der B-Zellentwicklung von Säugern und Hühnern wird im Folgenden zunächst die B-Zellentwicklung für Mensch und Maus und nachfolgend für das Huhn beschrieben.

2.1 B-ZELLENTWICKLUNG BEI MENSCH UND MAUS

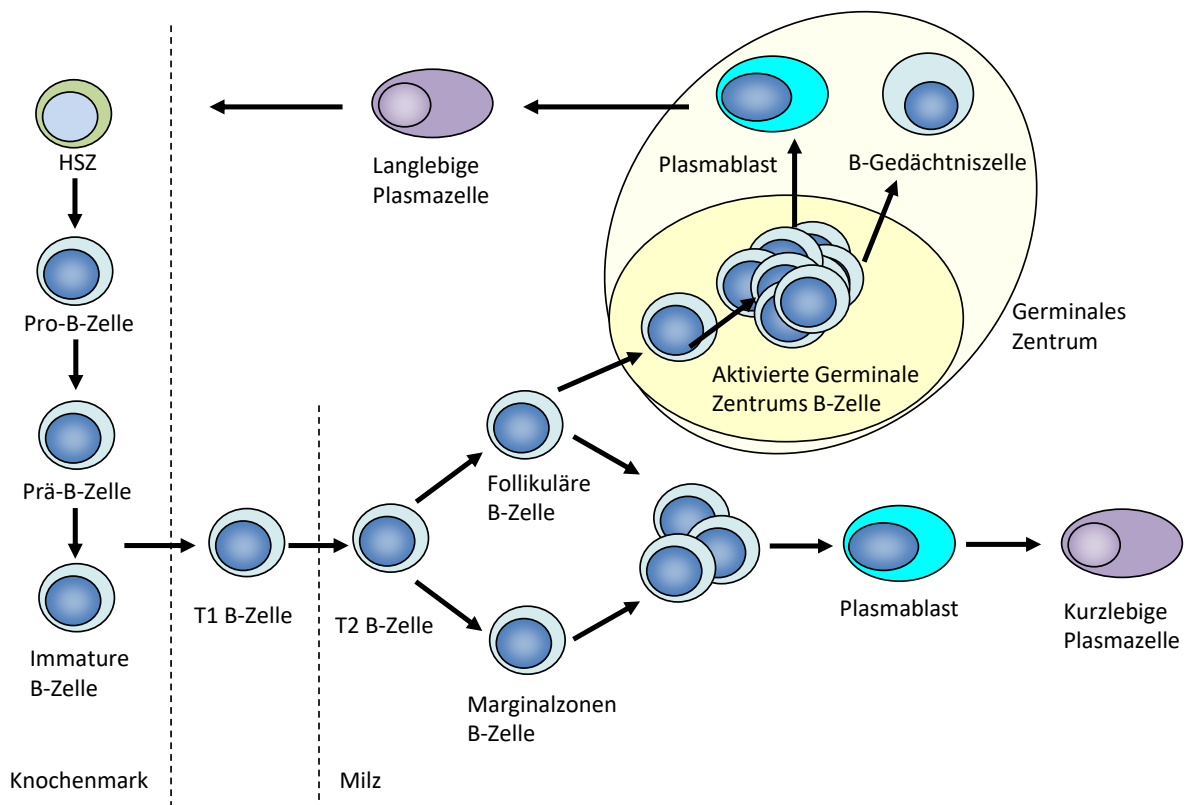


Abbildung 1: Überblick der B-Zellentwicklung bei Mensch und Maus
(modifiziert nach Rottach [4])

2.1.1 Von der hämatopoetischen Vorläuferzelle zur B-Zelle

Aus einer hämatopoetischen Vorläuferzelle entwickelt sich bei Mensch und Maus im Knochenmark lebenslang neben einer myeloiden Vorläuferzelle auch eine gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle, aus welcher in der weiteren Entwicklung B-, T- und NK-Zellen hervorgehen [5-7]. T-Zell-Vorläufer entwickeln sich abhängig vom Notch-Signal im Thymus weiter [8], wohingegen sich die B-Zell-Vorläufer durch ein von Stromazellen im Knochenmark bereitgestelltes Milieu aus Zytokinen und Adhäsionsmolekülen über Vorstufen zur frühen Pro-B-Zelle entwickeln. Durch Induktion spezifischer Wachstumsfaktoren wie E2A und EBF wird das Entwicklungspotential der Vorläuferzelle auf die B-Zelllinie festgelegt [9, 10]. Das Ziel des Differenzierungsprogramms ist die Expression des Immunglobulins auf der B-Zelloberfläche. Dabei wird in der frühen B-Zellentwicklung mit dem Gen-Rearrangement begonnen, einem Mechanismus zur geordneten Aneinanderreihung der verschiedenen Gensegmente der Immunglobulin-kodierenden Gene [11].

Dabei gibt es im Säuger für die schwere Kette einen Pool aus V-D und J-Segmenten, während für die leichte Kette V-, und J-Segmente vorkommen. Mensch und Maus zeichnen sich durch einen sehr großen Pool an V-, D- und J-Segmenten aus, woraus eine kombinatorische Vielfalt durch das Zusammenfügen der einzelnen DNA-Segmente resultiert. Durch nachfolgende Ausbesserung von fehlerhaft zusammengesetzten Segmenten wird die Diversität des Antigen-Erkennungs-Repertoires nochmals gegenüber Vertreter der GALT- (*gut-associated lymphoid tissue*) Spezies wie beispielsweise Kaninchen und Huhn, welche an den Ig-Loci weniger DNA-Segmente zur Umlagerung zur Verfügung haben, deutlich gesteigert. Wie diese Spezies ihr Antigen-Erkennungsrepertoire diversifizieren wird im Abschnitt der B-Zellentwicklung des Huhns besprochen.

Dabei bewirkt die Expression eines spezifischen Wachstumsfaktors die Expression nachgeschalteter Faktoren oder die wichtiger Proteine. Das Rearrangement beginnt am Locus der schweren Kette [12]; das Zwischenstadium mit verknüpftem DJ_h-Segment kennzeichnet den Übergang zur späten Pro-B-Zelle. Durch Verknüpfung eines V_h- Segments kann nun eine vollständige schwere Kette exprimiert werden. Das Rearrangement am Leichte-Kette-Locus erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt, deshalb wird zunächst ein Ersatz für die leichte Kette (L-Kette) exprimiert und kennzeichnet eine Prä-B-Zelle mit ihrem Prä-B-Zellrezeptor [13]. Die erfolgreiche Expression der schweren Kette und nachfolgend des Prä-BCR stellen wichtige Kontrollpunkte in der B-Zellentwicklung dar; bei fehlerhaftem Rearrangement an diesen Stellen greifen entweder Reparaturmechanismen oder es kommt zur Apoptose der B-Zelle [14]. Nachfolgend kommt es zur massiven Proliferation der Prä-B-Zellen [15] und die

leichte Kette wird rearrangiert. Nur B-Zellen mit erfolgreich rearrangiertem B-Zellrezeptor, bei welchem durch Mechanismen wie zum Beispiel dem Rezeptor-Editing sichergestellt wurde, dass er weder autoreaktiv noch reaktionsträge ist, verlassen als unreife B-Zellen das Knochenmark in Richtung Peripherie und gelangen zunächst zur Milz [16, 17]. Säuger-B-Zellen können bei Mensch und Maus durch Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle zu verschiedenen Zeitpunkten angesprochen werden. In der Milz durchläuft die unreife B-Zelle, welche sich durch eine hohe IgM- und eine niedrige IgD-Expression auszeichnet, die zwei Übergangsstadien T1 und T2 [18]. T2-B-Zellen wandern in den Marginalsinus der weißen Milzpulpa, werden zu Marginalzonen-B-Zellen und verbleiben dort als ruhende, nicht zirkulierende Zellen [19]. Ein Großteil der T2-B-Zellen, welche nun das Oberflächenmolekül CD21 exprimieren wandern in die Follikel der Milz oder Lymphknoten oder auch ins Knochenmark und werden zu naiven, langlebigen follikulären B-Zellen. Entweder trifft die B-Zelle nun auf ein spezifisches Antigen, durchläuft weitere Differenzierungsschritte und reift; oder sie geht bei fehlender Aktivierung zugrunde. 5% des B-Zellpools stellen bei Mensch und Maus die B1-Zellen, sie exprimieren viel IgM und wenig IgD und halten sich überwiegend in Körperhöhlen wie Peritoneal- und Pleurahöhle auf. B1- und Marginalzonen-B-Zellen zeichnen sich durch ein begrenztes Rezeptor-Repertoire aus und spielen in der frühen nicht- adaptiven Phase der Immunantwort eine bedeutende Rolle. Die B2 B-Zelle wird als konventionelle B-Zelle bezeichnet und unterscheidet sich durch ein diverseres Rezeptor-Repertoire und ihre höhere spontane Antikörper-Produktion. Ob es sich bei den B-Zell-Subtypen um verschiedene Linien mit gemeinsamer Vorläuferzelle handelt, wie es für $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta$ T-Zellen beschrieben wurde, oder um einen Selektionsschritt, ist noch nicht genau geklärt [20].

2.1.2 B-Zellreifung in der Peripherie

B-Zellen erkennen ihr passendes Antigen in der naiven, nicht prozessierten Form. Dabei wurde gezeigt, dass die Erkennung von membranständigem Antigen durch den B-Zellrezeptor *in vivo* effektiver ist, aber auch lösliches Antigen erkannt wird [21]. Bis die B-Zelle auf ihr spezifisches Antigen trifft, durchwandert sie die sekundär-lymphatischen Organe und gelangt über das Blut zu den T-Zellzonen in die Milz, um dann schließlich primäre Follikel zu besiedeln, welche hauptsächlich aus B-Zellen, aber auch Stromazellen bestehen und Überlebenssignale bereitstellen, wie zum Beispiel durch von Stromazellen produziertes BAFF [22]. Die Erkennung von exogenem Antigen durch den BCR induziert eine vermehrte Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, was dazu führt, dass die B-Zelle beim Durchwandern der Milz in der T-Zellzone festgehalten wird, wodurch der Kontakt mit einer

auf das gleiche Antigen geprägten T-Zelle wahrscheinlicher wird. Die Migration der B-Zellen zur T-Zellzone hin wird durch das feine Zusammenspiel von auf der B-Zelle hochregulierten Molekülen oder Rezeptoren und der Expression von Liganden und Rezeptoren auf T-Lymphozyten und Dendritischen Zellen reguliert [23]. In der frühen Immunantwort kommt es zur B-Zellvermehrung in sogenannten Primärfoci, bei welcher Antikörper mit geringerer Affinität entstehen, die sofort in der Lage sind den Organismus zu schützen. Zur Ausbildung einer vollständigen humoralen Immunantwort entstehen Germinale Zentren. In diesen kommt es zur germinalen Zentrumsreaktion, dabei laufen mehrere Zyklen von Proliferation und wichtige Modifikationen zur Optimierung der Effizienz der Immunantwort. Mittels somatischer Hypermutation kann die Rezeptoraffinität durch Austausch einer Aminosäure in der Antigenbindungsstelle des Immunglobulins gesteigert werden. Entsteht dagegen ein BCR geringer Affinität geht die B-Zelle durch Apoptose zu Grunde [24]. Außerdem wird ein Immunglobulin-Klassenwechsel vollzogen, so dass das Spektrum der Effektorfunktion der sezernierten Antikörper erhöht wird [25].

Die Germinalen Zentren bei Mensch und Maus sind aus einer hellen und einer dunklen Zone aufgebaut, welche von einer Mantelzone aus ruhenden B-Zellen umgeben sind. Die dunkle Zone besteht aus sich kontinuierlich teilenden Zentroblasten, welche dann zu Zentrozyten werden und in die helle Zone wandern, wo follikulär Dendritische Zellen (FDC) ein spezifisches Milieu zur Verfügung stellen [26]. Schlussendlich entwickeln sich die selektierten B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen mit höherer Antigen-Affinität oder zu B-Gedächtniszellen [27, 28].

2.1.2.1 Plasmazellen

Antikörper-sezernierende Plasmazellen können sich nach Antigenkontakt aus einer Marginal-B-Zelle, einer follikulären B-Zelle oder aus einer B-Gedächtniszelle entwickeln. Diese können je nach Herkunft kurz- oder langlebig sein [29]. Subpopulationen der aus Germinalen Zentren in Milz und Lymphknoten entstandenen Plasmazellen können über Jahre hinweg in einem durch spezialisierte Stromazellen zur Verfügung gestellten Mikromilieu, den sogenannten „Nischen“ im Knochenmark, überleben; oder sie gelangen in die rote Pulpa der Milz und überdauern dort [30]. Hierbei spielen die von Stromazellen produzierten Überlebensfaktoren BAFF und APRIL eine wichtige Rolle. Der Phänotyp einer Plasmazelle ist durch eine hohe Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 gekennzeichnet, welche die Plasmazelle zur Migration in CXCL12- reiche Lokalisationen wie der roten Milzpulpa, Markstränge der Lymphknoten oder Knochenmark befähigt. Die niedrige Expression von CXCR5 bewirkt, dass die Plasmazelle nicht in CXCL13-reichen B- oder T-Zellarealen

festgehalten wird [31]. Die Aktivierungsmarker MHCII und CD80 werden ebenfalls herunterreguliert [32, 33].

2.1.2.2 B-Gedächtniszellen

Langlebigkeit ist die Schlüsselrolle des immunologischen Gedächtnisses und kann sowohl für Plasma- als auch für B-Gedächtniszellen gelten [34]. B-Gedächtniszellen ruhen und sezernieren keine Antikörper; sie gehen als alternativer Differenzierungsschritt aus der GC-Reaktion hervor. Nach erneutem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen lösen sie eine schnellere und stärkere Immunantwort aus [33]. Diese kann, wie bei Versuchen mit Influenza gezeigt wurde, zu einer 100-fachen Erhöhung der zirkulierenden Plasmazellen innerhalb von sieben Tagen nach erneutem Antigenkontakt führen [35]. Humane B-Gedächtniszellen rezirkulieren im Blut, ihr größtes Reservoir findet sich jedoch in Milz und Knochenmark [36, 37]. Für das Überleben in sogenannten Nischen, einer Umgebung mit spezialisiertem Milieu, wurde im Mausmodell für Plasmazellen die Abhängigkeit von APRIL belegt [30], wohingegen postuliert wird, dass naive B-Zellen durch BAFF erhalten werden [38]. Das Überleben von B-Gedächtniszellen scheint von diesen Faktoren unabhängig zu sein und erfordert weitergehende Klärung [39]. Es gibt Hinweise, dass sich B-Gedächtniszellen während eines Gleichgewichtszustands langsam teilen [40, 41]. Für Mensch und Maus ist es möglich, die verschiedenen B-Zellstadien anhand der Kombination der Expression bestimmter Oberflächenmarker und Transkriptionsfaktoren je nach Entwicklungsstadium zu unterscheiden eine Auswahl an Markern ist in Tabelle 1 dargestellt.

Oberflächenmarker für die Identifizierung von B-Zell-Subpopulationen bei Mensch und Maus						
	B-Zell-Subpopulation					
	MZ B-Zelle	Follikuläre B2B-Zelle	B1 B-Zelle	GC-Zelle	Plasma-Zelle	Gedächtnis-Z
IgM	+++	+	+++	++	-	+
IgD	+/-	+++	+/-	-	-	+/-
CD19	+++	++	+++	+ / ++	++ / +	++
CD21	+++	++	+/-	+ / ++	-	++
CD23	+/-	++	-	+/-	-	-
CD27					+++	++
CD38_{Maus}	++	++	+	+/-	+	
CD38_{Mensch}	+++	++ / +		+++	+++	
CD40	+++	++	+	++	+/-	++
CD54		+/-		+++		
CD80/CD86	+++			+		+++
CD138	-	-	-	-	++	
MHCII	++	++	+++	++	+/-	+++
CXCR5	+	+	+	++	-	- / +
CXCR4	-	-	-	++	+ / ++	- / +

Tabelle 1: Oberflächenmoleküle zur Identifikation von B-Zell-Subtypen

MZ: Marginalzonen-B-Zelle, GC: Germinale Zentrums-B-Zelle

-: keine Expression +: schwache Expression ++ mittelstarke Expression +++ starke Expression leer: keine Angabe
Zusammenstellung nach Fairfax et al. [32], Smith et al. [42], Tedder et al. [43], Allman et al. [44]

2.2 B-ZELLENTWICKLUNG IM HUHN

Der Klasse der Vögel eigen ist ein auf die B-Zellentwicklung spezialisiertes Organ, die Bursa Fabricius. Das je nach Entwicklungsstadium beim Huhn ungefähr haselnussgroße, primäre lymphoide Organ stellt eine Ausstülpung des dorsalen Proctodaeum dar und befindet sich in der Nähe der Kloake [45]. Dieses Organ verlieh den B-Lymphozyten ursprünglich ihren Namen (Bursa-derived cells). Bei einigen anderen Haustierspezies (Kaninchen [46, 47], Schaf [48] Rind [49] und Schwein [50]) wurde nachgewiesen, dass die B-Zell-Entwicklung im sogenannten Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe stattfindet, weshalb sie unter dem Begriff „GALT-Spezies“ zusammengefasst werden [51]. Zu 95 % aus B-Zellen bestehend stellt die Bursa ein Hohlorgan dar, welches nach außen durch eine bindegewebige Kapsel abgegrenzt wird. 15 bis 20 großen Gewebefalten ragen in ihr Lumen hervor und bilden den Sitz der mit Lymphozyten dicht besiedelten Follikel. Diese funktionelle Einheit der Bursa bestehend aus Rinde und Mark und hat jeweils eine bis in die Rinde reichende eigene Gefäßversorgung [52]. Zwischen dem Hohlraum der Bursa und dem Lumen des Enddarms kann es durch Austausch löslicher Stoffe zum Kontakt zwischen Antigen und Lymphozyten kommen [53]. Im Huhn ist die B-Zell-Entwicklung, im Gegensatz zur lebenslangen Neubildung von B-Zellen im Knochenmark der Säuger [5], zeitlich begrenzt und kann aufgrund ihres zeitlichen Zusammenhangs mit der Bursa in eine präbursale, bursale und

postbursale Phase eingeteilt werden [45]. In Abbildung 2 ist die embryonale Besiedlung der Bursa durch Vorläuferzellen und die einsetzende Involution in histologischen Schnitten dargestellt.

2.2.1 Präbursale und bursale Phase der B-Zellentwicklung beim Huhn

Die Auswanderung von hämatopoetischen Vorläuferzellen aus dem mesenchymalen Bereich der späteren Aorta in den embryonalen Dottersack, Knochenmark, Milz und Leber beginnt ab Embryonaltag 5 (ET). Diese Vorläuferzellen sind bereits auf die B-Zelllinie festgelegt und exprimieren den Pan-B-Zellmarker Bu1, entwickeln sich Bursa unabhängig und können bereits IgM auf ihrer Oberfläche exprimieren [54].

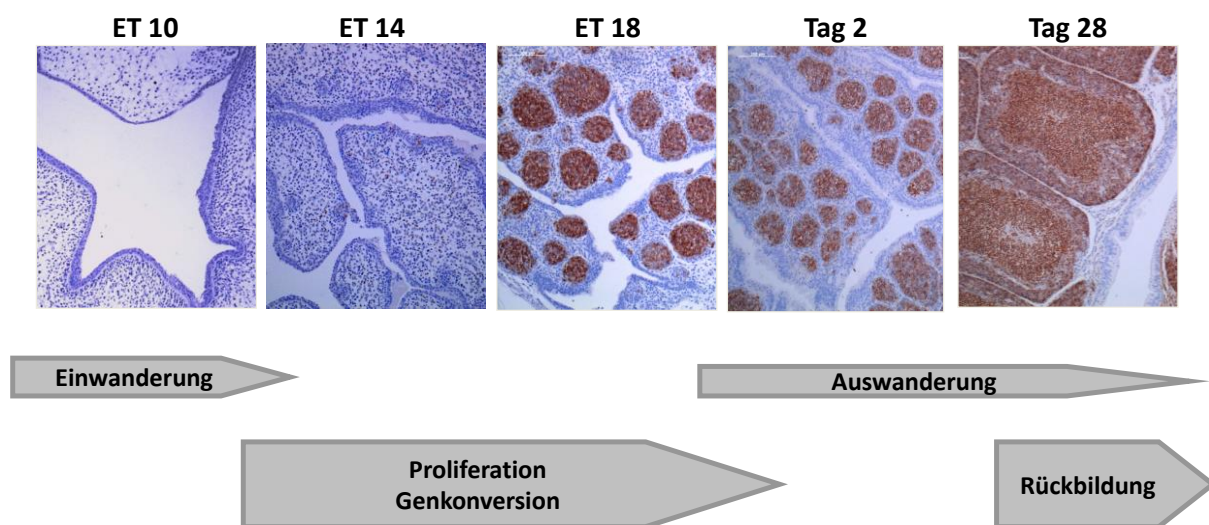


Abbildung 2: Embryonale Besiedlung der Bursa und Auswanderung der B-Zellen nach dem Schlupf
(mit freundlicher Genehmigung durch Härtle et al.) [55]

Zu diesem Zeitpunkt trägt jede präbursale B-Zelle einen nahezu identischen B-Zellrezeptor (BCR) auf ihrer Zelloberfläche und hat damit ein weniger vielfältiges Antigen-Erkennungs-Repertoire als das Äquivalent der Säugerspezies Mensch und Maus. Dies kommt zustande, weil im Vogel nur sehr wenige Genvarianten und Gensegmente zum Austausch für das Gen-Rearrangement des BCRs vorhanden sind [56, 57]. Die Besiedlung der Bursa durch die Vorläuferzellen erfolgt in einer Welle zwischen ET 8 und 14 [58]. Es kommt zu Umbauvorgängen in der Anordnung der Follikel und den umgebenden Zellen und schließlich zur massiven Proliferation der eingewanderten Lymphozyten, welche einen intakten BCR exprimieren [59, 60]. Mittels Genkonversion und somatischer Hypermutation wird ab ET 13 der BCR diversifiziert, hierbei werden Teile des Immunglobulins durch Segmente sogenannter Pseudogene ersetzt, so dass das resultierende Antigen-Erkennungs-Repertoire des Huhns dem von Mensch und Maus nicht unterlegen ist [61-63]. Von den proliferierten

B-Zellen verlassen nur 5 % die Bursa in Richtung Peripherie, emmigrieren über das Blut und besiedeln sekundär lymphatische Organe wie Cäcaltonsille und Milz, dabei weisen sie einen „recent-bursal-emigrants“ Phänotyp auf ($IL12^+/MHCII^{high}$), welcher sie als zeitnah aus der Bursa ausgewandert charakterisiert. Die restlichen 95 % der bursalen Lymphozyten sterben in der Bursa ab. Es wurde festgestellt, dass die apoptotisch zu Grunde gehenden Zellen die Expression von IgM auf der Oberfläche verlieren, folglich wurde angenommen, dass nur B-Zellen mit erfolgreich exprimiertem BCR in der Lage sind aus der Bursa auszuwandern [64, 65]. Neuere Erkenntnisse mit generierten Knockout Hühnern (Ig-Ko, leichte Kette-Ko) von Schusser et al. konnten bestätigen, dass die Expression der schweren Kette des Immunglobulins als Signalgeber notwendig ist, damit die immature B-Zelle aus der Bursa emmigrieren kann. [66, 67]. Abbildung 3 zeigt die wesentlichen Unterschiede der B-Zellentwicklung zwischen Maus, Mensch und Huhn.

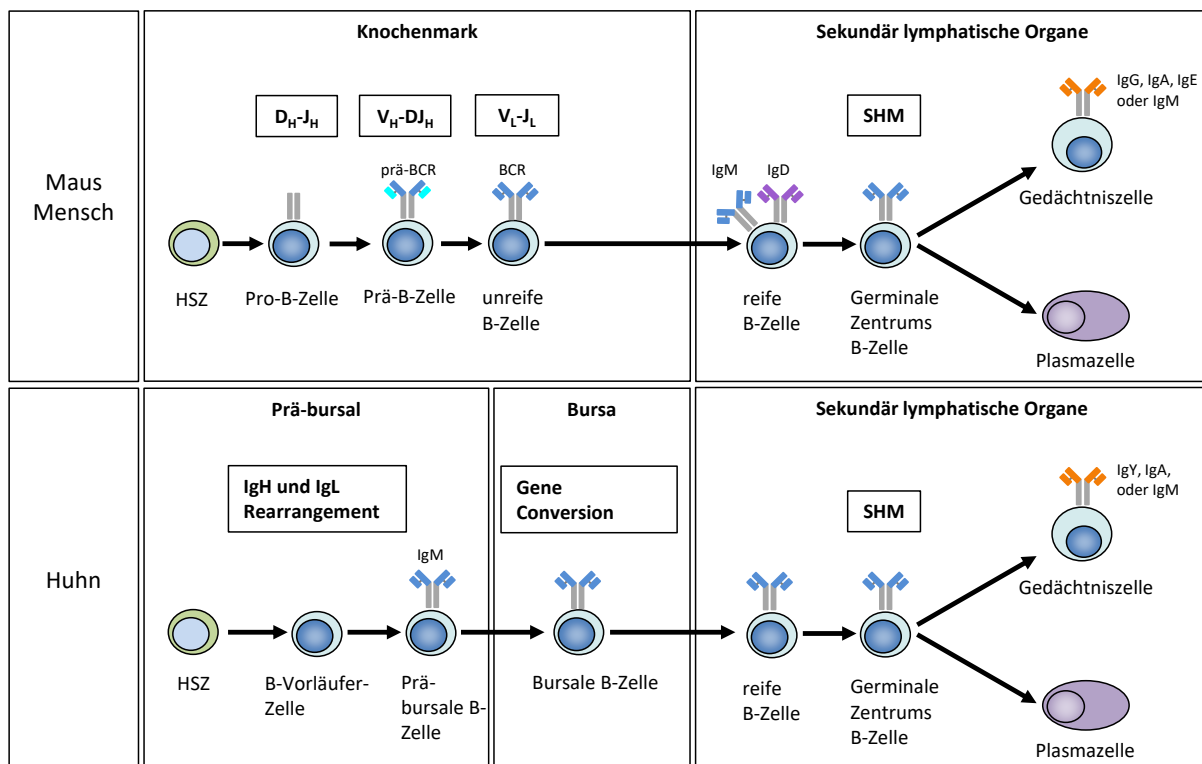


Abbildung 3: B-Zellentwicklung vergleichend Maus, Mensch / Huhn

Während beim Mensch das VDJ-Rearrangement am Lokus der schweren Kette beginnt und zur Ausbildung eines prä-B-Zellrezeptors führt, erfolgt beim Huhn zeitgleich das Rearrangement der schweren und leichten Kette, was in der Expression von oberflächlichem IgM auf den präbursalen B-Zellen resultiert. In der Bursa erfolgt die Diversifizierung des B-Zellrezeptors durch Genkonversion und durch somatische Hypermutation im germinalen Zentrum (modifiziert nach Kohonen et al. 2007 [68])

2.2.2 Postbursale B-Zellentwicklung beim Huhn

Die postbursale Phase beginnt für jede B-Zelle mit dem Verlassen der Bursa. Mit Einsetzen der Geschlechtsreife kommt es zur Rückbildung der Bursa. Durch Studien an bursektomierten Hühnern konnte herausgefunden werden, dass nach Involution der Bursa drei verschiedene

periphere B-Zellpopulationen im Blut nachweisbar sind, wobei zwei Populationen Bursa-abhängig entstehen, die dritte Population aber extra-bursale Vorläuferzellen besitzen muss, da sie auch bei bursektomierten Tieren zu finden ist. 60 % der gesamten peripheren B-Zellpopulation bestehen aus sich schnell teilenden, kurzlebigen Zellen mit einer Lebenserwartung von 2-3 Tagen, die das Antigen LT2 exprimieren [69]. Höchstwahrscheinlich entstammt diese LT2⁺ Population dem Follikelcortex, da LT2 auch von den Zellen im Kortex auch exprimiert wird [70]. 30-35 % der Blut- B-Zellpopulation weisen den oben beschriebenen „recent-bursal-emigrants“ Phänotyp auf (IL12+/MHCII^{high}), sind aber LT2 negativ, weshalb davon ausgegangen wird, dass sie aus der bursalen Medulla stammen und sie sind deutlich langlebiger (2-3 Wochen). Bei der dritten im Blut vorkommenden Population handelt es sich wahrscheinlich um eine Bursa-unabhängige B-Zellpopulation, diese ist LT2 und chL12 negativ und kurzlebig (ca. 2 Tage). Sie beinhaltet bei 3 Wochen alten Tieren nur ca. 5 % der B-Zellen im Blut, der Anteil steigt jedoch mit Involution der Bursa. Der genaue Mechanismus zur Aufrechterhaltung des B-Zell Pools nach der Rückbildung der Bursa ist unklar und bedarf weiterer Forschung [71].

Das Huhn besitzt zwar keine Lymphknoten wie sie für den Säuger beschrieben werden, jedoch sind neben der Milz als sekundäres lymphatisches Organ eine Vielzahl von Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben (MALT *mucosa-associated lymphoid tissues*) wie die beiden Caecaltonsillen, die Hadersche Drüse und das Bronchus-assoziierte-lymphatischen Gewebe für den Antigenkontakt und das Zusammentreffen von B- und T-Lymphozyten wichtig. Embryonal findet die Lymphopoese neben Dottersack und Knochenmark auch in der Milz statt. In der Milz findet das Rearrangement des Immunglobulins statt, wodurch die präbursalen B-Lymphozyten einen B-Zellrezeptor geringer Diversität exprimieren. Nach Verlassen der Bursa wandert die immature B-Zelle in die oben beschriebenen sekundären lymphatischen Organe ein. Nach dem Schlupf fungiert die Milz auch im Vogel als sekundäres lymphoides Organ und stellt eine spezialisierte Umgebung für die Zusammenkunft von B- und T-Zellen zur Verfügung. Die Hühner-Milz ist ein rundes bis ovales Organ, welches der linken Seite des Proventrikulus anliegt. Der Grundaufbau der aviären Milz entspricht dem der Säuger, sie besteht aus roter und weißer Pulpa, allerdings gibt es einige strukturelle Unterschiede [72]. Die rote Pulpa trägt wie auch im Säuger kurz nach dem embryonalen Auftreten der Milzanlage zur Blutbildung bei. In der späteren Entwicklung filtert sie alternde Erythrozyten aus dem zirkulierenden Blutstrom, speichert aber keine großen Vorräte an Erythrozyten, wie es aus dem Säuger bekannt ist [73]. Die weiße Pulpa der Milz besteht aus T-Zellzonen, welche die großen Arterien umgeben, in sogenannten Periarterial lymphoid

Sheath (PALS), wobei hier auch vereinzelt B-Zellen an den Gefäßaufzweigungen vorkommen können. Die B-Zellareale befinden sich in der Periellipsoidalen weißen Pulpa (PWP), welche die Penizillarkapillaren umgeben [52]. Die morphologische Abgrenzung von B-Zellfollikel und einer sie umgehenden Marginalzone ist im Gegensatz zum Säuger nicht möglich [74]. Sicher festgestellt wurde, dass es analog zum Säuger nach Antigenkontakt zur Bildung von Germinalen Zentren (GC) kommt [75].

2.2.2.1 Germinale Zentren im Huhn

Analog zum Säuger kommt es nach Antigenkontakt zur Bildung von Germinalen Zentren. Allerdings befinden sich aviäre GCs nicht wie im Säuger in B- sondern in T-Zellarealen und erscheinen histologisch homogener [75, 76]. Immunhistochemische Versuche mit inkorporiertem *Bromdesoxyuridin* (BrdU) ergaben einen Ring aus stark proliferierenden Zellen unter einer kollagenen Kapsel in dessen Mitte sich CD4⁺-T-Helferzellen und follikulär dendritische Zellen befanden, sodass eine zonale Trennung in eine subkapsuläre dunkle Zone und eine zentrale helle Zone analog zu der Aufteilung im Säuger angenommen wird [74]. Der Ursprung des GCs aus wenigen aktivierten B-Zellen wurde im Huhn belegt, ebenso die Modifizierung des BCR durch Genkonversion und somatische Hypermutation [77, 78]. Ebenso wurde IgA und IgY immunhistochemisch nachgewiesen, was die Annahme bestätigte, dass es auch im GC des Huhns zum Ig-Klassenwechsel kommt [74, 79]. Allerdings fehlen noch eindeutige Studien um funktionell zu belegen, dass auch in Vogel-GCs eine durch Antigen induzierte Steigerung der Rezeptoraffinität stattfindet.

2.2.2.2 Plasmazellen im Huhn

Über die Zwischenstufe eines Plasmablasten entwickelt sich die B-Zelle auch im Huhn zu einer Plasmazelle, welche auf die Produktion großer Mengen an Immunglobulinen spezialisiert ist. Beim Huhn kommen neben IgM- und IgA-positiven Plasmazellen auch der Isotyp IgY vor. Strukturell stellt IgY eine Mischung aus dem IgG und IgE des Säugers dar und entspricht funktionell dem Säuger IgG [80]. Um Hühner-Plasmazellen von anderen B-Zellpopulationen eindeutig abzugrenzen fehlen Marker. Die Identifizierung von Plasmazellen im Huhn erfolgt bislang über ihre Morphologie im Elektronenmikroskop und die stark positive Färbung für Immunglobuline. Jeurissen et al. gelang der immunhistologische Nachweis von IgM-sezernierenden Zellen 48 h nach einer Immunisierung in T-Zellarealen der Milz. 72 h nach Immunisierung fand er diese Zellen dann in der roten Pulpa der Milz, nach 96 h konnten erste IgY-sezernierende Zellen detektiert werden [81]. Auch in anderen Mukosa-assoziierten lymphatischen Geweben wie der

Caecaltonsille, der Lamina propria des Darms und der Harderschen Drüse, konnten vermehrt IgY-, IgA- oder IgM-positive Zellen nachgewiesen werden [55]. Über die Lebensdauer der entstehenden Plasmazellen der für sie notwendigen Überlebenssignale im Huhn ist noch nichts bekannt.

2.2.2.3 B-Gedächtniszellen im Huhn

Über die Langlebigkeit von B-Zellen ist im Huhn bislang nichts bekannt. Ob es wie im Säuger spezielle Nischen im Knochenmark gibt, welche ein spezielles Milieu zur Aufrechterhaltung von Plasma- und Gedächtniszellen gibt, kann aufgrund fehlender Marker keine Aussage getroffen werden.

2.3 AUF B-ZELLEN EINWIRKENDE ZYTOKINE

Zytokine sind kleine Peptide, die von Zellen des Immunsystems sezerniert werden und die Immunantwort modulieren. Sie beeinflussen alle Differenzierungsstadien von B-Zellen essentiell. Eine besonders wichtige Rolle während der B-Zell-Entwicklung und Differenzierung übernehmen die Interleukine 2, 4, 5, 6, 10 und 21. IL 2 wirkt proliferativ auf B-Zellen und fördert ihre Differenzierung, die Wichtigkeit dieses Zytokins wird bei Gendefekt des IL2 Rezeptors sichtbar; betroffene Patienten leiden im Säuglingsalter an einer schweren bis letalen Immunschwäche. IL4 führt zur Stimulation bereits aktivierter B-Zellen und bewirkt einen Isotopklassenwechsel zu IgE des sezernierten Immunglobulins. Frühe Studien belegten die durch IL6 induzierte Differenzierung zur Antikörper sezernierender Plasmazelle und die Rolle als Überlebensfaktor für langlebige Plasmazellen. Es übt ebenfalls Einfluss auf aktivierende, nicht jedoch auf ruhende primäre B-Zellen, sowie auf bestimmte B-Zell-Lymphome aus [82-84]. Dagegen übernimmt IL5 während der murinen B-Zellentwicklung eine sehr wichtige Funktion [85]. Durch die Verfügbarkeit der Sequenzierung des Hühnergenoms im Jahr 2004 [86] wurde es möglich, nach zum Säuger homologen Molekülen zu suchen, für welche funktionelle Eigenschaften als B-Zellwachstumsfaktoren in der humanen oder murinen B- Zellentwicklung nachgewiesen worden war. Das zur Arbeit mit Hühnerleukozyten zur Verfügung stehende Repertoire an Zytokinen ist im Vergleich zum Säuger limitiert. Im Folgenden soll auf die B-Zellwachstumsfaktoren eingegangen werden, welche für diese Arbeit ausgewählt wurden. Zunächst wird die nachgewiesene Funktion im Säuger und nachfolgend, die wenn vorhandene, bekannte Funktion im Huhn beschrieben.

2.3.1 Tumornekrosefaktor-Familienmitglieder

Das erste Mitglied dieser wichtigen Molekülfamilie wurde durch ihren Entdecker Carswell im Jahr 1975 als Tumornekrosefaktor- α benannt, weil festgestellt wurde, dass ein aus infizierten Mäusen gewonnenes Serum nekrotische Eigenschaften auf Tumorzellen ausübte [87]. Die Wichtigkeit der Tumornekrosefaktor (TNF) Familie und ihren Rezeptoren für die Ausbildung eines gesunden Immunsystems wurde durch einen funktionellen Knockout im Mausmodell mit einem anderen Mitglied der Familie, dem Tumornekrosefaktor- β , auch Lymphotoxin- α genannt, erkannt. Die Mauslinie mit deletiertem Lymphotoxin- α -Gen konnte keinerlei Lymphknoten ausbilden und wies eine stark veränderte Architektur peripherer lymphoider Organe auf [88]. Die Funktionen der TNF-Familie beschränken sich nicht auf das Immunsystem, sondern sind an vielen biologischen Prozessen innerhalb der Gesamtheit des Zellstoffwechsels beteiligt. Zwei Vertreter, für welche eine besonders wichtige Rolle im B-Zellhaushalt sowohl von Säugern als auch von Hühnern nachgewiesen werden konnte, wurden auch für diese Arbeit ausgewählt und im Folgenden näher beschrieben.

2.3.1.1 CD40L

Die zentrale Rolle des Rezeptor-Liganden-Paars CD40-CD40L für die T-Zellabhängige Antikörperantwort wurde durch die Klärung der Pathogenese des „Hyper-IgM-Syndroms“ entdeckt. Erkrankte Patienten zeigten auffällig hohe IgM-Antikörperspiegel, wiesen jedoch reduzierte Serumspiegel von IgG, IgA und IgE auf. Als Ursache zeigte sich, dass durch ein Defekt im CD40L-Gen, das zweite zur Aktivierung der B-Zelle notwendige Signal fehlt, um zu reifen und einen Ig-Klassenwechsel durchzuführen [89]. Der Rezeptor CD40 wird auf B-Zellen, Dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und auch auf Thrombozyten exprimiert. Außerhalb der Zellen des Immunsystems auch auf Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen [90]. Der zugehörige Ligand CD40L, in der Literatur auch unter den Bezeichnungen CD154 und TNFSF5 zu finden, wird membranständig auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimiert, aber auch in löslicher Form von diesen abgegeben [91]. CD40L wurde auch auf aktivierten B-Zellen und Thrombozyten nachgewiesen. Innerhalb einer Entzündungsreaktion wurde für CD40L im Arteriosklerosemodell zusätzlich eine Expression auf Monozyten, Natürlichen Killerzellen, Mastzellen und basophilen Granulozyten detektiert [92-94]. Die Hauptwirkung der T-Zellabhängigen B-Zell Hilfe durch CD40L ist die Induktion von B-Zellproliferation, die Initiierung und Aufrechterhaltung der Germinalen Zentrumsreaktion, die mit ihr einhergehende Affinitätsreifung und der Immunglobulin-Klassenwechsel [95]. Die zur B-Zell-Aktivierung benötigten Signale sind in Abbildung 4 dargestellt.

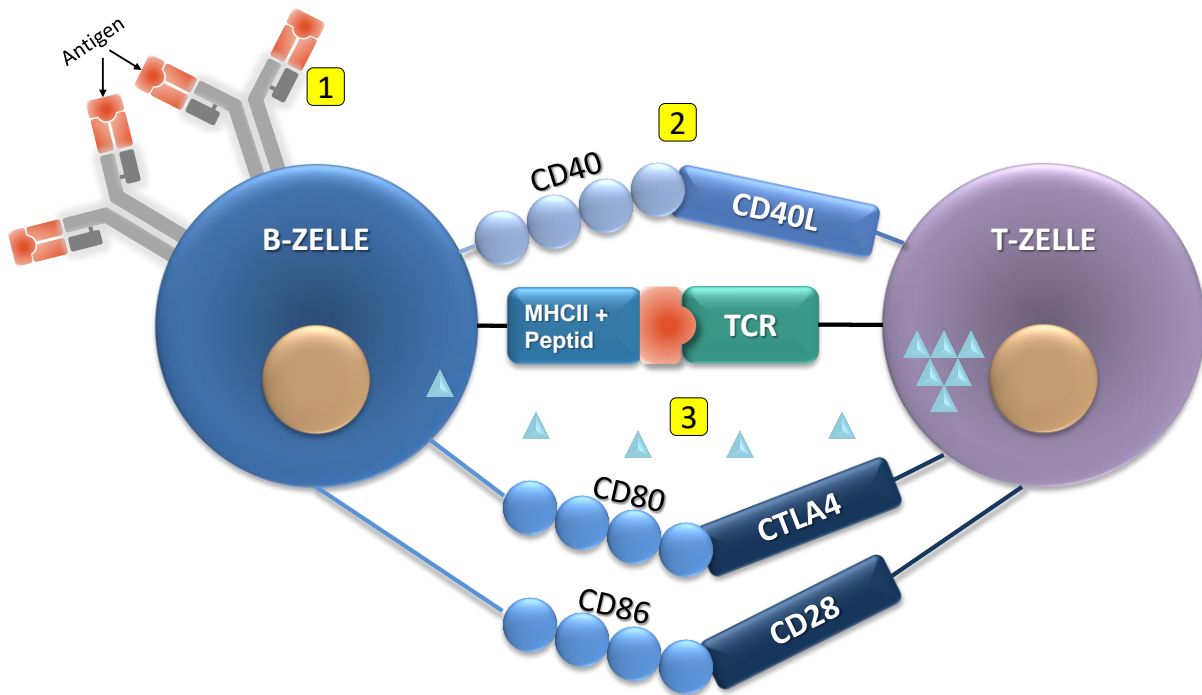


Abbildung 4: Schematische Darstellung der B-Zellaktivierung

Das erste Signal (1) der B-Zellaktivierung stellt die Antigenbindung über den BCR dar, das zweite die Kostimulation durch die T-Zellhilfe via CD40 und CD40L (2). Das dritte Signal der durch die T-Zelle sezernierten Zytokine (3) fördert die B-Zellaktivierung. (Modifiziert nach Janeway's Immunobiology, 2015 [20])

Nachdem die B-Zelle durch Antigenkontakt aktiviert wurde, kommt es zur Internalisierung des BCRs mit seinem gebundenen Antigen. Dieses wird von der B-Zelle prozessiert, um über ihr MHCII-Klasse-II Molekül der aktivierten T-Zelle präsentiert zu werden. Es kommt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse, welche die intensivste Interaktion zwischen B- und T-Zelle unter anderem über die Expression akzessorischer Adhäsionsmoleküle ermöglicht [96]. Dabei exprimiert die aktivierte T-Helferzelle nun die kostimulatorischen Moleküle CD40L und CD28 vermehrt auf ihrer Oberfläche [97]. Das zweite benötigte Aktivierungssignal erfährt die B-Zelle über die Ligation ihres CD40 Rezeptors mit dem CD40L der T-Zelle. Dabei konnte in aktuellen Studien gezeigt werden, dass CD40L während der Interaktion nicht nur membranständig auf der T-Zelle verbleibt, sondern auch zu einem gewissen Teil durch CD40-vermittelte Endozytose in die B-Zelle aufgenommen wird [91]. Die CD40-Ligation bewirkt eine vermehrte Expression von weiteren kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 und MHCII auf B-Zellen, was ihre Antigen-präsentierende Eigenschaft verbessert und gleichzeitig die Aktivierung von T-Helferzellen steigert [98]. Bei alleinigem Signal 2 durch CD40L-Stimulation kommt es zur Induktion der Apoptose durch die Aktivierung des Fas-FasLigand Pathways [99].

2.3.1.2 CD40L im Huhn

Auch im Huhn wurde das CD40-CD40L-System identifiziert und weitergehend charakterisiert. Mithilfe einer EST-Datenbank von aktivierten T-Zellen konnte ein Molekül nachgewiesen werden, das zu 44-49 % mit der Aminosäuresequenz des Säugers homolog ist [100]. Es gelang mittels löslichem rekombinant hergestellten CD40L der Nachweis des CD40 Rezeptors auf allen B-Zellen aus Bursa, Blut und Milz, sowie auf Hühner-Monozyten und Thrombozyten. Kothlow et al. konnte die Rolle des CD40-CD40L System für die Hühner B-Zellen näher charakterisieren. Die Kultivierung mit CD40L ermöglichte zum ersten Mal bis zu dreiwöchige Langzeitkultivierungen primärer Lymphozyten aus der Milz. Die Überlebensrate bursaler Lymphozyten konnte ebenfalls deutlich gesteigert werden. CD40L induzierte Proliferation in Hühner B-Zellen aus Milz und Bursa. Dabei wurde festgestellt, dass CD40L aktivierte B-Lymphozyten den Pan B-Zellmarker Bu1 herunterregulieren und einen Plasmablast ähnlichen Phänotyp aufweisen. CD40L-Stimulation verstärkte in Hühner-B-Zellen die Antigen-präsentierende Eigenschaft durch vermehrte Expression des MHC-Klasse-II Moleküls und förderte die Sekretion von IL6 [101]. In phänotypischen Charakterisierungen der langzeitkultivierten Milzlymphozyten mit CD40L wurden verschiedene CD80⁺-B-Zellpopulationen gefunden. Eine Population verlor über die Zeit ihre CD80-Expression, hier wurde vermutet, dass es sich wahrscheinlich um terminal differenzierte Plasmazellen handeln könnte, wohingegen die andere B-Zellpopulation auch nach längerer Stimulation CD80⁺ blieb, hier könnte es sich um B-Gedächtniszellen handeln [102].

2.3.1.3 BAFF

Das Zytokin BAFF (B cell activating factor of the tumor necrosis factor family), das Produkt des TNFSF13B Gens (Tumor Necrosis Factor Superfamily Member 13b) auch BLyS (B-lymphocyte stimulator) genannt, wurde als Überlebens- und Reifungsfaktor von Säuger-B-Zellen identifiziert [103, 104]. Durch einen BAFF-Knockout im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass unreife B-Zellen im Knochenmark noch nicht auf BAFF angewiesen sind, jedoch bei Fehlen von BAFF 90 % der reifen B-Zellen in Milz und Blut gegenüber gesunden Tieren deletiert sind [105, 106]. Die Überexpression von BAFF in genetisch transgenen Tieren vergrößerte den peripheren B-Zellpool und führte zu einer Autoimmunerkrankung ähnlich dem *Sjögrens-Syndrom* des Menschen, bei welchem auch erhöhte BAFF-Spiegel gemessen wurden [107-109]. BAFF wird wie für TNF-Familienmitglieder typisch sowohl membrangebunden, als auch löslich produziert [110]. BAFF wird konstitutiv von Stromazellen und follikulär dendritische Zellen in lymphatischen

Gewebe von Stromazellen produziert [111], im Falle einer Entzündungsreaktion kann die Produktion von BAFF in Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Neutrophilen induziert werden [112], wodurch B-Zellansammlungen am Ort der Entzündung gefördert werden [113]. Das besondere an diesem TNF-Familienmitglied ist, dass es an drei verschiedene Rezeptoren BCMA (B-cell maturation antigen), TACI (Transmembrane activator and CAML interactor) und BAFF-R (BAFF-Rezeptor) binden kann. Während BAFF-R nur von BAFF gebunden werden kann, besitzen BCMA und TACI einen weiteren Liganden APRIL. Dieser spielt beim Überleben von Plasmazellen in Knochenmarknischen mit spezialisiertem Mikromilieu eine Rolle [114]. Die Forschergruppe um Ettinger et al. konnte zeigen, dass BAFF+IL21 synergistisch auf eine spezielle Subpopulation von Marginalzonen B-Zellen (MZA B-Zelle) mit einem $\text{IgG}^+\text{CD21}^{\text{high}}\text{CD23}^{\text{low}}\text{CD27}^{\text{high}}$ Phänotyp hin zur Differenzierung zu IgG1 sezernierenden Plasmazellen getrieben wird. Diese besondere Zellpopulation zeichnet sich durch ihre Hypersensitivität gegenüber IL21 aus und ihrer Fähigkeit auf exklusiv auf die Kombination von IL21 und BAFF mit einer schnellen Differenzierung zur Plasmazelle zu reagieren. Dies geschieht Antigen unabhängig ohne das Miteinbeziehen des BCR oder des CD40 Signals, auf den Stimulus der Zytokine hin [115]. Die Fähigkeit von BAFF als Ersatz für das CD40-Signaling zu dienen scheint in der Tatsache begründet zu sein, dass Signaltransduktion durch BAFF und durch CD40-Aktivierung über gemeinsame Teilschritte der NFkB-Signalkaskade verfügen [116, 117]. Allerdings ist die Signaltransduktion über BAFF nicht in der Lage den durch IL21 mediierten Zelltod zu überwinden, wenn die Koligation des BCR mit involviert ist [118].

2.3.1.4 BAFF im Huhn

Mithilfe einer Bursa-EST Datenbank konnte BAFF im Hühnengenom mit einer 76 %igen Übereinstimmung zur Aminosäuresequenz im Säuger identifiziert werden. Nach erfolgreicher Klonierung stand ein rekombinantes lösliches Molekül für funktionelle Studien zur Verfügung [119]. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit bindet es auch an BAFF-Rezeptoren im Säuger. Es wurden allerdings auch Unterschiede im BAFF-System der Säuger zum Huhn aufgedeckt. Interessanterweise wurde BAFF-mRNA neben Milz und Bursa auch in B-Zellen selbst nachgewiesen, sodass von einer durch B-Zellen autokrinen BAFF-Produktion ausgegangen wird [119-121]. Intensive Studien im Säuger postulieren eine BAFF-unabhängige frühe B-Zellentwicklung im Knochenmark [106], wohingegen die Entwicklung der immatures B-Zellen der Bursa auf BAFF angewiesen sind. Wie im Säuger hat BAFF auch im Huhn mehrere Rezeptoren; TACI konnte erfolgreich identifiziert werden, für BCMA wurden Teile des Gens entdeckt, wobei es sich hier nicht um ein funktionell

codierendes Gen sondern um ein Pseudogen handelt. BAFF-R bindet ausschließlich BAFF. Dagegen bindet TACI auch APRIL, allerdings bestehen momentan nur Hinweise auf das Vorkommen von APRIL im Hühnergenom. Im Gegensatz zum Säuger wird BAFF-R ausschließlich auf B-Zellen exprimiert [119, 120].

In Vitro konnte rekombinantes BAFF die Überlebensrate von B-Zellen aus der Milz und Bursa des Huhns steigern, ohne dabei Proliferation zu induzieren, somit konnte die Kultivierbarkeit von Hühner B-Zellen wesentlich verlängert werden [122]. *In vivo* führte die Überexpression von BAFF mittels retroviralem Gentransfer zu einem Anstieg der B-Zellfrequenz in Milz und Caecaltonsillen und zu einer Steigerung von Antikörperspiegeln. Die Blockade von endogenem BAFF durch retrovirale Expression eines humanen Rezeptors führte umgekehrt zur Hemmung der B-Zellentwicklung [123]. Somit konnte BAFF nicht nur wie im Säuger als wichtiges Überlebenssignal peripherer B-Zellen identifiziert werden, sondern es konnte auch die Wichtigkeit von BAFF für immature B-Zellen der Bursa belegt werden.

2.3.2 Interleukin 10

Interleukin 10 (IL10) gehört zu den Typ II Zytokinen der IL10-Familie, bestehend aus den weiteren Zytokinen IL19, IL20, IL22, IL24, IL26, und IL29 [124, 125]. Unter anderem ist IL10 für seine immunsuppressiven Eigenschaften bekannt, es ist ein die Immunantwort stark modulierendes pleiotropes Zytokin, welches zwischen B- und T-Zellen und anderen Immunzellen vermittelt. Die Hauptaufgabe von IL10 besteht im Rahmen einer Erreger- eliminierenden Immunantwort darin, die proinflammatorischen Mechanismen zu regulieren, bevor es durch diese zur Schädigung des Organismus kommt [126, 127]. Zunächst wurde die IL10-Produktion den Th2-Zellen zugeschrieben und fügte sich in das Denkmuster der Trennung in eine proinflammatorische Th1- und eine antiinflammatorische Th2-Immunantwort ein [128], doch die Liste der IL10 produzierenden Zellen wurde bald um viele Zelltypen einschließlich B-Zellen [125, 129, 130], Mastzellen, Eosinophile Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen [131, 132] erweitert. Der IL10-Rezeptor (IL10-R) wird von allen hämatopoetischen Zellen konstitutiv exprimiert, diese Expression kann durch inflammatorische Stimuli verstärkt werden.

Auf B-Zellen wirkt IL10 in allen Entwicklungsstadien angefangen von der Vorläufer- hin zur reifen B-Zelle [133] proliferativ. Dazu ist die Ligation des kostimulatorischen Moleküls CD40 auf der B-Zelle notwendig und kann durch die Zytokine IL2 und IL4 synergistisch verstärkt werden [134]. IL10 fördert das Überleben über die Regulation der Expression

antiapoptotischer Proteine wie BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) [135, 136] und der Telomerase-Aktivität [137]. Der Einfluss von IL10 auf B-Zellen wird zum einen durch den Aktivierungszustand der B-Zelle, zum anderen durch die Anwesenheit zusätzlicher Zytokine moduliert. Eine durch CD40 aktivierte B-Zelle wird gegenüber anderen Zytokinen ansprechbarer [138, 139]. Bei Kostimulation führt IL10 zu einem Immunglobulinklassenwechsel zu IgG₁ und IgG₃. In Anwesenheit von TGFβ wird ein Ig-Klassenwechsel zu IgE und IgA initiiert [140]. Für eine terminale Differenzierung muss das CD40-Signal allerdings unterbrochen werden, so dass unter fortwirkendem IL10- und IL2- Einfluss, aus proliferierenden Plasmablasten enddifferenzierte Antikörper-sezernierende Plasmazellen entstehen könne [141].

2.3.3 Interleukin 10 im Huhn

Hühner-IL10 wurde aus einer EST Datenbank der Caecaltonsille identifiziert und erfolgreich kloniert. Es weist eine zu 42 bis 45 % konservierte Aminosäuresequenz zum homologen Säuger-IL10 auf. Das Expressionsniveau von IL10-mRNA war in Bursa und Caecaltonsille hoch, dagegen in Thymus, Leber und Lunge niedrig. Interessanterweise zeigte das Huhn keine Expression von IL10 mRNA in Milz und Knochenmark wie das für Mensch und Maus gezeigt werden konnte, die Expression von IL10 war in diesen Geweben auch nicht durch Mitogen-Aktivierung induzierbar. Auch im Huhn wurde für IL10 eine immunsuppressive Eigenschaft bestätigt. Durch Studien an *Eimeria maxima* infizierten Hühnern konnte Rothwell et al. zeigen, dass im Huhn durch IL10 eine Interferon-induzierte Immunantwort auf den Erreger verhindert wird, was dazu beiträgt, dass der Erreger nicht eliminiert werden kann [142]. Kürzlich gelang es Rothwell et al. mithilfe gegen Hühner-IL10 generierter Antikörper, einen massiven Anstieg des IL10 korrelierend mit der Höhe der festgestellten Läsionen nach Infektion mit *Eimeria Tenella in vivo* nachzuweisen. *In vitro* konnte die Funktion von IL10 als Feedback-Regulator auch für das Huhn bestätigt werden, IL10-neutralisierende Antikörper verhinderten die durch IL10 induzierten Interferonsynthese von LPS-stimulierten Makrophagen [143]. Den proliferativen Effekt von IL10 bei Kostimulation mit CD40L auf B-Zellen des Huhns aus der Milz, konnten bereits laborinterne Vorarbeiten zeigen. Auch in Hühner-B-Zellen kommt es durch Stimulation mit CD40L+IL10 zum IL10-induzierten Klassenwechsel zu IgY und IgA; durch Wegnahme des CD40L-Signals nach drei Tagen unter anhaltender IL10-Stimulation kann der Klassenwechsel noch verstärkt werden [102].

2.3.4 Interleukin 21

Im Jahr 2000 wurde IL21 zuerst im Zellkulturüberstand aus aktivierten $CD3^+$ -Zellen identifiziert. Es gehört strukturell zur Gruppe der Zytokine, die zur Signalweiterleitung einen Typ I Zytokin-Rezeptor mit einer gemeinsamen γ -Kette binden, wie auch die Zytokine IL2, IL4, IL7, IL9, and IL15 [144, 145]. IL21 wird hauptsächlich von $CD4^+$ T-Zellen produziert, wohingegen sein Rezeptor IL21-R auf humanen B-Zellen, NK-Zellen, aktivierten T-Zellen und einigen nicht-hämatopoetischen Zellen vorkommt [144, 145]. Die Studien der letzten Jahre beleuchteten herausragende Funktionen von IL21, sowohl im physiologischen Geschehen zellulärer und humoraler Immunität, als auch in der Pathologie der Autoimmunität, was zur Erforschung von IL21 für klinische Anwendungen im Rahmen der Bekämpfung von Autoimmunerkrankungen geführt hat [146, 147]. Es hat pleiotrope Wirkung auf die Differenzierung von B- und T-Zellen, erstere ist in Abbildung 5 dargestellt.

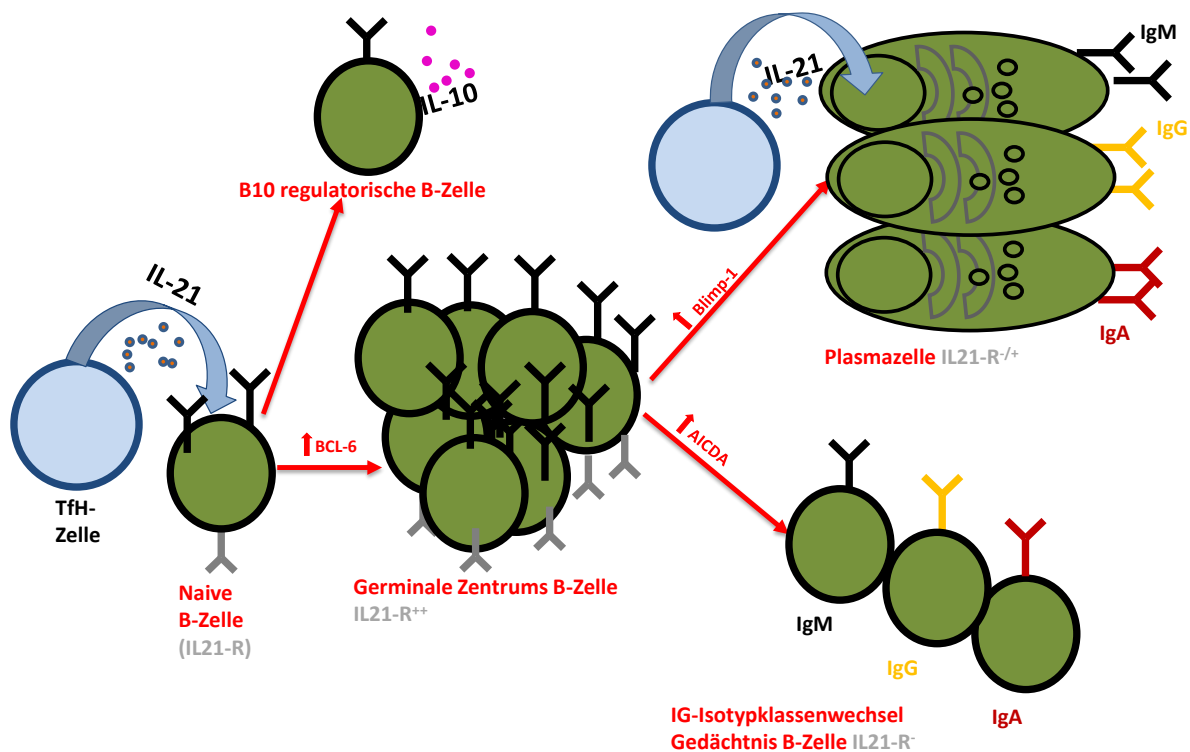


Abbildung 5: Einfluss von IL21 auf die Differenzierung von B-Zellen
(modifiziert nach Tangye 2015)[146]

Es wurde gezeigt, dass IL21 bei Mensch und Maus B-Zell stimulierende Eigenschaften hat und hauptsächlich von T-Helferzellen (Th1, Tfh, Th17) [148, 149] produziert wird. Der zugehörige IL21-Rezeptor findet sich vermehrt auf B-Zellen. IL21 wirkt an der Germinalen Zentrumsreaktion mit, induziert in B-Zellen einen Klassenwechsel zu IgG3, IgG1 und IgA [150-152] und fördert in B-Zellen eine Differenzierung zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle [148]. In der Literatur wird IL21 als das potenteste der humanen

B-Zell-tropischen Zytokine neben IL2, IL4, IL6 und IL10 beschrieben, welches fähig ist die humorale Immunantwort zu beeinflussen [118, 153].

Bei gleichzeitiger CD40-Ligation zeigt keine andere bekannte Zytokinkombination das gleiche Potential wie IL21 [115, 148]. Mithilfe einer neueren Studie an porcinen B-Zellen konnte der synergistische Effekt von CD40L und IL21 auch auf B-Zellen einer GALT-Spezies nachgewiesen werden. Während IL21 alleine nur sehr geringe Proliferationsraten in porcinen B-Zellen induzierte, verhalf eine Kostimulation mit CD40L zu einer starken Proliferation und einem 2,5 –fachen Anstieg der Zellzahl [154].

Die Schlüsselrolle des Synergie-Effekts zwischen CD40L+IL21 stellt die optimale Beladung der regulatorischen Domänen der Genloci dar [155, 156]. Es konnte gezeigt werden, dass CD40L und IL21 über mindestens zwei verschiedene Wege kollaborieren, um die Blimp-1 Expression, einem bedeutenden Protein in der terminalen Differenzierung zur Plasmazelle, zu fördern [155, 157, 158]. Weiterhin verbessert IL21 die Ansprechbarkeit von murinen B-Zellen gegenüber T-Zellhilfe durch verstärkte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf B-Zellen [159] und verlängert das Überleben von humanen Plasmazellen *ex vivo* [160]. Zusätzlich zur Vermehrung und Differenzierung von B-Zellen beeinflusst IL21 auch deren Überleben, abhängig davon welche STAT-(*Signal transducer and activator of transcription*) Faktoren durch das zelluläre Signaling über den IL21-R aktiviert werden. Kommt es durch vermehrte STAT1-Aktivierung zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose, wird dagegen vermehrt STAT3 aktiviert, wirkt dieses als antiapoptotischer Wachstumsfaktor, was unter anderem auch in zahlreichen maligne veränderten B-Zellen gezeigt wurde [161, 162]. Die Fähigkeit Apoptose zu induzieren unterscheidet IL21 von den anderen Mitgliedern der gemeinsamen γ -chain Zytokinfamilie [163, 164]. Interessant ist auch, dass im frühen Stadium einer Infektion, wenn IL21 durch benachbarte T-Zellen ohne direkte T-Zellhilfe bereitgestellt wird, die Differenzierung zu Granzym-B sezernierenden zytotoxischen B-Zellen eingeleitet wird, die in der Lage sind infizierte Zellen abzutöten. [165] Obwohl IL21 fähig ist die Differenzierung zur Plasmazelle kostimulatorisch zu induzieren, sind Gedächtniszellen aus der Milz gegenüber IL21 sehr viel sensibler und können durch IL21 die Umwandlung von B-Gedächtniszellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen vollziehen [115].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass IL21 Überleben und Proliferation von adäquat aktivierten B-Zellen fördert. Im Gegensatz dazu, inhibiert IL21 die Proliferation oder induziert Apoptose in den B-Zellen, welche ein unspezifisches Signal durch den BCR oder ein starkes Signal via TLR erfahren haben [153].

2.3.5 Interleukin 21 beim Huhn

Das orthologe Gen für IL21 im Huhn, wurde durch RT-PCR auf RNA aus stimulierten Milzzellen gewonnen. Es zeigt eine 20-30 % Übereinstimmung zu anderen Säuger-Orthologen. Im Huhn wird IL21 in den meisten lymphoiden Organen exprimiert, überdurchschnittlich von $CD4^+ TCR\alpha\beta^+$ T-Zellen. Wie auch für Säuger gezeigt wurde, verstärkt IL21 die T-Zellproliferation und inhibiert die Reifung von Dendritischen Zellen [166].

3 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es die Wirkung von ausgewählten Zytokinen auf immature und mature B-Zellen des Haushuhns zu analysieren.

Hierfür wurden Lymphozyten aus Bursa und Milz mit CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimuliert und die Reaktion der Zellen mit verschiedenen Methoden untersucht.

Neben der Induktion von Zellproliferation wurde auch die Zahl lebender Zellen nach Kultivierung sowie eine Veränderung der Expression verschiedener Oberflächenmarker untersucht.

4 MATERIAL UND METHODEN

Die Hochzahlen beziehen sich auf die im Anhang alphabetisch aufgeführten Bezugsquellen. Zur besseren Lesbarkeit wurden im Ergebnisteil Tausendertrennpunkte verwendet.

4.1 HÜHNERHALTUNG

Um mit primären Hühnerleukozyten arbeiten zu können, wurden Eier der Hühnerlinie M11 (B^{2/2}-Haplotyp) vom Institut für Tierzucht in Mariensee zur Verfügung gestellt und am Institut für Tierphysiologie der LMU München unter Standardbedingungen bebrütet. Bis zur Organentnahme (Milz und Bursa) in dem für die Versuche und Fragestellungen adäquaten Alter der Hühner, wurden diese in ausgestalteten Volieren in kleinen Gruppen von vier bis acht Tieren gehalten. Zur Aufzucht erhielten die Hühner handelsübliches Alleinfuttermittel für Legehennen und Wasser ad libitum. Die Blutentnahme erfolgte mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 55.2-1-54-2532.0-60-2015).

4.2 GEWINNUNG VON PRIMÄREN HÜHNERLEUKOZYTEN

Material

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,2 1

8,00 g Natriumchlorid (NaCl)¹

1,45 g Di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na₂HPO₄ x 2H₂O)¹

0,2 g Kaliumchlorid (KCl)¹

0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄)¹

ad 1000 ml Aqua dest.

Einsatz in der Zellkultur nach Sterilisation durch autoklavieren

Einstellen des pH-Werts mit HCl und NaOH auf 7,4

Biocoll Separating Solution²

Trypanblau-Lösung², Zählkammer (modifiziert nach Neubauer)³

Heparinlösung (500 IU ml)

5 ml Heparin-Natrium (25.000 IU/5 ml)⁴

45 ml RPMI 1640 mit Glutamax⁵

Spritzenstempel²⁰ und Metallsieb⁷ (Maschenweite 0,75 x 0,75 mm)

4.2.1 Gewinnung von Leukozyten aus Blut

Die Blutentnahme erfolgte mittels 5 oder 10 ml Spritzen, mit 0,2 ml Heparinlösung beschichtet, und Kanülen der Größe 27 Gauge aus der rechtsseitigen V. jugularis. Das heparinisierte Vollblut wurde im Verhältnis 1:1 mit Raumtemperatur (RT) warmem PBS gemischt und vorsichtig auf eine *Biocoll Seperating Solution*-Phase in einem zuvor befüllten 50 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Um eine Trennung der Leukozyten von restlichen Blutbestandteilen zu erhalten, wurden 10 ml Hühnerblut auf 10 ml *Biocoll Seperating Solution* pro Zentrifugenröhrchen nicht überschritten. Nach 12-minütiger Zentrifugation bei RT mit 600 xg (ohne Bremse) wurden die, der *Biocoll Seperating Solution* Lösung aufliegenden, Leukozyten sofort abgenommen, in ein frisches 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit PBS aufgefüllt. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 225xg für 10 Minuten wurden die Zellen pelletiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen.

4.2.2 Gewinnung von Leukozyten aus Bursa und Milz

Die Organentnahme erfolgte im Sektionsbereich des Tierstalls nach Betäubung durch Kopfschlag und Tötung durch Blutenzug. Das Federkleid wurde mit Alkohol benetzt und die Körperhöhle von ventral unsteril eröffnet. Zum Transport wurden Bursa und Milz mit sterilem Besteck entnommen und in ein mit PBS gefülltes Zentrifugenröhrchen überführt. Im Zellkulturlabor wurde die Präparation der Zellen unter sterilen Bedingungen weitergeführt. Das PBS wurde verworfen und das jeweilige Organ mit einem Spritzenstempel durch ein in frischem PBS liegendes Sieb mit der Maschenweite 0,75 x 0,75 mm gedrückt, um die Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Je Organ wurde ein steriles Metallsieb verwendet. Das Sieb wurde mit 50 ml PBS nachgespült und das Organ-PBS-Gemisch einige Male resuspendiert. Verbleibende größere Gewebestücke konnten durch ruhige Lagerung der Zentrifugenröhrchen für 10 Minuten bei RT sedimentieren. Der sedimentfreie Überstand wurde abgenommen und die Zellen durch Zentrifugation bei 225xg für 10 Minuten bei RT pelletiert und danach in 10 ml Medium resuspendiert. 10 ml der Organsuspension wurden in einem Volumen von 10 ml pro Zentrifugenröhrchen auf 10 ml *Biocoll Seperating Solution* überschichtet, um dann wie in 4.2.1 beschrieben, weiterverarbeitet zu werden.

4.2.3 Mikroskopische Beurteilung der Leukozyten

Nach der Präparation der Leukozyten durch Dichtezentrifugation wurden 10 µl der Zellsuspension in einem Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt, in einer modifizierten Zählkammer nach Neubauer gezählt und gleichzeitig die Vitalität der Zellen mikroskopisch beurteilt. Tote Zellen erscheinen dunkelblau angefärbt, vitale Zellen dagegen rundlich transparent.

4.3 ZELLKULTUR

4.3.1 Medien und Zusätze

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Zusätze bei 4 °C gelagert.

Standardmedium

450 ml RPMI 1640⁵

50 ml fötales Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS)²

Hühnerleukozyten-Medium / Kulturmedium

445 ml Basal Iscove Medium²

40 ml FBS²

10 ml Hühnerserum⁴

5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung (Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 µg/ml)²

Lagerung des FBS und der Penicillin-Streptomycin-Lösung als Aliquot von 10°ml bei 20 °C.

Einfriermedium

9 ml FBS²

1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, (CH₃)₂SO)¹

Lagerung als Aliquots von 10 ml bei 20 °C

Coolcell Einfrierbox¹²

Puromycin¹, 2 µg/ml

Genitacin²³, 250 µg/ml

CD40L Zellkulturüberstand (ZKÜ), BAFF ZKÜ, IL10 ZKÜ, IL21 ZKÜ

4.3.2 Verwendete Zelllinien

Name	Herkunft, Spezies	Transformation	Vektor/ Tag	Selektions-antibiotikum	Referenz
HEK-293-T	Embryonale Zellen, Niere, Mensch	Humanes Adenovirus	-	-	[167]
HEK-293-Flag-BAFF	Embryonale Zellen, Niere, Mensch	Humanes Adenovirus	PCR3-HA-Flag PS	Geneticin ²³ G418 250 µg/ml	[122]
2C10 (HEK-293-msCD8-CD40L)	Embryonale Zellen, Niere, Mensch	Humanes Adenovirus	pcIpac	Puromycin ¹ 2 µg/ml	[100, 168]
2B6 (HEK-293-Flag-IL10)	Embryonale Zellen, Niere, Mensch	Humanes Adenovirus	PCR3-HA-Flag PS	Geneticin ²³ G418 250 µg/ml	[102]

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien

Zur Gewinnung der Zytokine CD40L, BAFF, IL10 wurden die mit dem für das jeweilige Zytokin kodierende Plasmid stabil transfizierten Zelllinien in Standardmedium kultiviert. Das Zytokin IL21 wurde durch die transiente Transfektion von 293-T Zellen generiert (siehe 4.4.1).

4.3.3 Kultivierung von Zelllinien

Alle zwei bis drei Tage wurden die semi-adhären Zellen im Standardmedium sorgfältig vom Boden des Kulturgefäßes abgeklopft, zwei Drittel des Volumens abgenommen und durch frisches Standardmedium ersetzt. Zur Erhaltung des Selektionsdrucks wurde bei jeder dritten Passage das für das jeweilige Resistenzgen das spezifische Antibiotikum zugegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

4.3.4 Kultivierung von primären Zellen

Nach der Präparation der Leukozyten aus Bursa und Milz (siehe 4.2.2) wurden die Zellen auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt und in die vorgelegte Zytokin-Mediumlösung gegeben, so dass die Zellen ohne größere Unterbrechung ihrer Stoffwechselaktivität in den Brutschrank bei 40 °C und 5 % CO₂ verbracht werden konnten. Die Kultivierung von Bursalymphozyten erfolgte in allen Versuchen für 24 h, wohingegen Milzleukozyten immer für 48 h in Kultur verblieben. Je nach Versuchsansatz erfolgte die Kultivierung in 24-Flachlochplatten mit 1 ml Kulturmediumzellsuspension je Kavität, wobei die Konzentration der Bursalymphozyten 5×10^6 Zellen pro ml betrug, die Konzentration der Milzleukozyten hingegen $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml. Wurden 96-Flachlochplatten mit 200 µl je Kavität verwendet, betrug die Dichte der Bursazellen 5×10^5 Zellen pro Kavität, die Dichte der

Milzleukozyten hingegen $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung. Die zur Stimulation der Leukozyten verwendeten Zytokin-haltigen Zellkulturüberstände wurden in unterschiedlicher Konzentration eingesetzt, CD40L in einer 1:10 Verdünnung, BAFF und IL10 in einer 1:50 Verdünnung und IL21 in einer 1:20 Verdünnung in Hühnerleukozytenmedium.

4.3.5 Einfrieren von Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff¹⁰³ gelagert. Pro Kryovial wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen bei 225xg für 10 Minuten zentrifugiert und in 1,8 ml Einfriermedium aufgenommen und zügig in eine Coolcell-Einfrierbox¹² transferiert, die ein langsames Einfrieren von 1°C/min im -80 °C Gefrierschrank gewährleistet. Nach einem Mindestaufenthalt von 12 h bei -80 °C konnten die Kryovials in die Tanks mit flüssigem Stickstoff verbracht werden.

4.3.6 Auftauen von Zellen

Das Kryovial mit den eingefrorenen Zellen wurde im 37 °C warmen Wasserbad bis zum Verbleib eines kleinen Eiskristallkerns aufgetaut und zügig in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Unter Schwenken des Röhrchens wurde dann tropfenweise 20 ml 4 °C kaltes RPMI hinzu pipetiert. Nach Zugabe von 20 ml RPMI wurde das Zentrifugenröhrchen rasch auf 50 ml Volumen aufgefüllt und bei 225xg und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Zur weiteren Kultivierung wurde das Zellpellet in das den Bedürfnissen der Zellart genügende Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche angemessener Größe überführt.

4.4 HERSTELLUNG DER REKOMBINANTEN ZYTOKINE

4.4.1 Transiente Transfektion von 293-T Zellen mit IL21

Material

HEK-293-T Zellen

Sterile Petrischalen¹⁹

Transfektionsreagenz Eugene²²

IL21-pCIneo Plasmid DNA⁸

Positivkontrolle: pEGFP-N1 Plasmid DNA^{laborintern}

Am Tag vor der Transfektion der HEK-293-T Zellen wurden diese in einer Petrischale mit 60 cm² Wachstumsfläche in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen pro Schale ausgesät und

über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert, so dass die Zellen am Tag der Transfektion 50-60 % konfluent waren. Vor Arbeitsbeginn wurden alle benötigten Reagenzien auf RT erwärmt. 10 µg der IL21 Plasmid DNA wurden in 500 µl RPMI in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zunächst gemischt und dann mit 30 µl des Transfektionsreagenz Fugene für 10 Minuten bei RT inkubiert. Dabei war wichtig, dass das Transfektionsreagenz ohne Wandkontakt in das Medium-DNA-Gemisch pipetiert wurde, da es sonst zu unerwünschten Reaktionen des Transfektionsreagenz mit der Kunststoffwand kommen konnte. Nach einmaligem Invertieren des Gefäßes wurde das Gemisch vorsichtig auf die, zuvor mit frischem Medium versorgten Zellen gegeben und nach leichten Schwenken wurde das Kulturgefäß zurück in den Brutschrank gestellt und für weitere 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 48 h wurde der Zellkulturüberstand vorsichtig abgenommen, für 10 Minuten bei 225xg zentrifugiert und bis zur weiteren Analyse bei 4 °C gelagert.

4.4.2 Gewinnung der Zytokine aus dem Überstand stabil transfizierter Zelllinien

Alle zwei bis drei Tage wurde Zellkulturüberstand der stabil transfizierten Zelllinien gewonnen und für 10 Minuten bei 225xg zentrifugiert. Bis zu einem Volumen von 1200 ml wurde der gewonnene Überstand in einem sterilen Gefäß zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

4.4.3 Konzentrierung der rekombinanten Zytokine

Material

400 ml Amicon Rührzelle⁶

Filter Diaflo Ultrafiltration Membranen, 10.000 Da, 76 mm¹⁹

Spritzenvorsatzfilter für Sterilfiltration 0,22 µm¹⁹

CD40L ZKÜ, BAFF ZKÜ, IL10 ZKÜ, IL21 ZKÜ

Durchführung

Das gesammelte ZKÜ-Volumen von 1200 ml wurde mithilfe einer Amiconrührzelle durch eine Filtermembran gedrückt und auf ein Volumen von 60 ml eingengt. Vor Arbeitsbeginn wurde die Filtermembran für 30 Minuten in Aquadest. gelegt, nach Hersteller-Angaben in die Apparatur eingespannt und anschließend die Rührzelle unter einer Stickstoff (N₂)- Atmosphäre bei 3,5 bar betrieben. Es wurden jeweils 300 ml ZKÜ in die Rührzelle eingefüllt und gleichzeitig der Durchfluss in einem sterilen Becherglas aufgefangen. Dieser Vorgang wurde mehrmals wiederholt, dabei stand die Rührzelle auf einem Magnetrührer, der

durch gleichmäßiges langsames Rühren Ablagerungen auf dem Filter verringern konnte. Der Vorgang der Konzentrierung wurde bei 4 °C in einem Kühlraum durchgeführt und im Anschluss durch einen 0,22 µm-Spritzenvorsatzfilter steriltfiltriert, in 2 ml Reaktionsgefäß aliquotiert und bei 4 °C aufbewahrt.

4.4.4 Nachweis der rekombinanten Zytokine im ELISA

Zum Nachweis der rekombinanten Zytokine CD40L, BAFF und IL10 im konzentrierten Zellkulturüberstand wurde ein *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) verwendet. Es wurde entweder das Flag-Epitop (BAFF, IL10) oder das Maus- CD8- α -Tag (CD40L) detektiert.

Material

NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatten¹²

Beschichtungspuffer pH 9,6

3,11 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3)¹

6 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)¹

ad 1000 ml Aqua bidest.

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 9,6 eingestellt, die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Magermilchlösung 4 % (wurde kurz vor Gebrauch angesetzt)

4 g Magermilchpulver¹

ad 100 ml PBS

PBS-T (0,05 % Tween20)

0,5 ml Tween20¹

ad 1000 ml PBS

TMB-Puffer

8,2 g Na-Azetat (CH_3COONa)¹

3,15 g Zitronensäure-Monohydrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{xH}_2\text{O}$)¹

ad 1000 ml Aqua bidest

Lagerung bei 4 °C

TMB-Stammlösung

6mg 3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)¹

ad 1 ml DMSO

Lagerung lichtgeschützt bei Raumtemperatur

TMB Gebrauchslösung

10 ml TMB-Puffer 37°C

332 µl TMB Stammlösung

3,0 µl 30 % H₂O₂¹

kurz vor Gebrauch ansetzen und sofort verwenden

Schwefelsäure 1 M¹

Proben

CD40L ZKÜ, CD40L ZKÜ konzentriert

BAFF ZKÜ, BAFF ZKÜ konzentriert

IL10 ZKÜ, IL10 ZKÜ konzentriert

Verwendete Antikörper siehe Tabelle 3

Antikörper	Gebundenes Antigen	Isotyp	Tierart	Konzentration/Verdünnung	Hersteller
CD40L-ELISA					
AV71	CD40L/ chCD154	IgG1	Maus	5 µg/ml	8
anti-muCD8a-Biotin	muCD8a	IgG2a	Ratte	0,5 µg/ml	25
Streptavidin-POD	Biotin			1:4000	9
BAFF-ELISA					
anti-Flag M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1 µg/ml	12
anti-BAFF S120	BAFF	IgG (polyklonal)	Kaninchen	5 µg/ml	laborintern
anti-rabbit-IgG-POD	rbIgG (H+L)	IgG (polyklonal)	Ziege	1:10.000	26
IL10-ELISA					
M2	Flag-Epitop	IgG1	Maus	1 µg/ml	12
M2-POD	Flag-Epitop	IgG1	Maus	5 µg/ml	12

Tabelle 3: Übersicht der im ELISA verwendeten Antikörper

Durchführung

Alle Volumenangaben beziehen sich auf eine Kavität einer *NUNC-Maxisorp Polystyren* 96-Lochplatte. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurde die Platte mit Hilfe eines ELISA-Washers dreimal mit PBS-T gewaschen. Die Inkubationen erfolgten für 60 Minuten bei RT. Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die Antikörperverdünnungen in PBS. Eine

NUNC-Maxisorp Polystyren 96-Lochplatte wurde mit 100 µl der Antikörpers in Beschichtungspuffer befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am darauffolgenden Morgen wurde der Beschichtungspuffer mit überschüssigem nicht gebundenem Antikörper durch dreimaliges Waschen mit Hilfe eines ELISA-Washers entfernt und nicht besetzte Bindungsstellen durch Aufbringen von 200 µl einer 4 %iger Magermilchlösung für mindestens eine Stunde bei RT blockiert. Nach Entfernen der Magermilchlösung mithilfe des ELISA-Washers konnten nun die konzentrierten Zellkulturüberstände aufgetragen werden. Die Proben wurden zuvor auf einer separaten Platte verdünnt und in einer log₂ oder log₃ Verdünnung auf die ELISA-Platte aufgetragen. Als positiv-Kontrolle wurde gereinigtes Protein (CD40L-ELISA) oder eine Protein mit Flag-Epitop-Markierung (BAFF-ELISA, IL10-ELISA) verwendet. Auch der Durchfluss wurde gemessen, um die erfolgreiche Konzentrierung zu bestätigen. Die Detektion erfolgte dem Protokoll des jeweiligen ELISA entsprechend (siehe Tabelle 3-5) durch das Aufbringen von 50 µl eines POD konjugierten sekundären Antikörpers und die anschließende Entwicklung mit der auf 37 °C vorgewärmten TMB-Gebrauchslösung. Bei Vorhandensein des nachzuweisenden Antigens färbte sich die Lösung nach 5-10-minütiger Inkubation im Dunkeln blau. Die Peroxidasereaktion wurde mit 50 µl einer 1M Schwefelsäurelösung ohne weiteren Waschschrift gestoppt, dadurch kam es zum Farbumschlag nach Gelb. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung bei $\lambda=450$ nm im Plattenphotometer. Im Folgenden sind die Abläufe der jeweiligen ELISA in Stichpunkten tabellarisch aufgeführt.

4.4.4.1 Tabellarische Durchführung der spezifischen ELISA

Ablauf	Verwendete Antikörper	Menge	Zeit
Beschichtung	AV71	100 µl/well	Über Nacht 4 °C
Blockierung	4 % Magermilch in PBS	200 µl/well	1 h RT
Proben	CD40L-ZKÜ CD40L-ZKÜ konz.	100 µl/well	1 h RT
Sekundärantikörper	rt-anti-muCD8a-Biotin	50 µl/well	1 h RT
Detektion	Streptavidin-POD	50 µl/well	1 h RT
Entwicklung	TMB-Gebrauchslösung	100 µl/well	10 min
Abstoppen	Schwefelsäure	50 µl/well	sofort messen

Tabelle 4: Durchführung CD40L-ELISA

Ablauf	Verwendeter Antikörper	Menge	Zeit
Beschichtung	M2-anti-Flag	100 µl/well	Über Nacht 4 °C
Blockierung	4 % Magermilch in PBS	200 µl/well	1 h RT
Probe	BAFF-ZKÜ BAF-ZKÜ konz.	100 µl/well	1 h RT
Sekundärantikörper	S120 anti - BAFF	100 µl/well	1 h RT
Detektion	gt-anti-rbIgG-POD	50 µl/well	1 h RT
Entwicklung	TMB-Gebrauchslösung	100 µl/well	10 min
Abstoppen	Schwefelsäure	50 µl/well	sofort messen

Tabelle 5: Durchführung BAFF-ELISA

Ablauf	Verwendeter Antikörper	Menge	Zeit
Beschichtung	M2-anti-Flag	100 µl/well	Über Nacht 4 °C
Blockierung	4 % Magermilch in PBS	200 µl/well	1 h RT
Probe	IL10-ZKÜ IL10-ZKÜ konz.	100 µl/well	1 h RT
Sekundärantikörper	M2 anti-Flag-POD	50 µl/well	1 h RT
Entwicklung	TMB-Gebrauchslösung	100 µl/well	10 min
Abstoppen	Schwefelsäure	50 µl/well	sofort messen

Tabelle 6: Durchführung IL10-ELISA

4.4.5 Nachweis von IL21 im Proliferationsassay mit [³H]-Thymidin

Das Vorhandensein des Zytokins IL21 im ZKÜ der transient transfizierten 293-T-Zellen wurde durch den Nachweis der biologischen Funktion im Proliferationsassay mit [³H]-Thymidin bestätigt (Durchführung siehe 4.5). IL21 wurde log₂ titriert; in Medium allein und mit CD40L zusammen.

4.5 PROLIFERATIONSASSAY MIT [³H]-THYMIDIN

Die Proliferation von stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten wurde durch den Einbau von radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin in die DNA von sich teilenden Zellen quantifiziert.

Material

Bursa- und Milzlymphozyten in Einzelzellsuspension

CD40L, BAFF, IL10, IL21 ZKÜ konzentriert

Hühnerleukozyten-Medium

[³H]-Thymidin¹¹

Szintillationsflüssigkeit²⁴

Glasfilter²⁴

Unifilter-9erGF/C, Microplate²⁴

Durchführung

Die Verdünnung der zu untersuchenden Zytokine wurde in einer sterilen 96-Flachlochplatte mit Hühnerleukozytenmedium vorgelegt und im Brutschrank auf 40 °C erwärmt. Die Dichte der Lymphozyten betrug für die Milz $2,5 \times 10^5$ Zellen pro Kavität und für die Bursa 5×10^5 Zellen pro Kavität. Die Lymphozyten wurden in einem Volumen von 100 µl auf die vorgelegten Zytokinverdünnungen gegeben, so dass die Zellen nach Präparation schnellst möglich zur Inkubation in den Brutschrank verbracht werden konnten. Zur Stimulation wurde CD40L in einer 1:10 Verdünnung, IL21 1:20, BAFF und IL10 in einer 1:50 Verdünnung eingesetzt. Alle Zytokinkombinationen wurden als Triplikate angesetzt, als Kontrollen dienten unstimulierte Zellen. Das Markieren der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 20 µl [³H]-Thymidin pro Delle, was einer Aktivität von 0,5 µCi/ml bzw. 18,5 kBq pro Delle entspricht, nach einer Stimulationszeit der Bursalymphozyten von 24 h bzw. Milzlymphozyten von 48 h im Brutschrank bei 40 °C und 5 % CO₂. Beide Lymphozytenkulturen wurden nach Markierung für weitere 16 h bei 40 °C und 5 % CO₂ inkubiert und bis zur Messung bei -20°C tiefgefroren aufbewahrt. Nach dem Auftauen der 96-Flachlochplatten konnten die Lymphozyten mit Hilfe eines Zellerntegeräts (*Topcount Perkin Elmer*) auf einen Glasfilter überführt werden. Dieser wurde bei 70 °C für 15 Minuten getrocknet und danach in eine Multiscreenplatte eingespannt. Pro Delle wurden 20 µl der Szintillationsflüssigkeit („*Microscint*“) aufgetragen und die Platte mit einer transparenten Klebefolie abgedichtet. Der Zerfall des in die Zell-DNA integrierten [³H]-Thymidin wurde als Funktion der Zerfälle pro Minute (cpm=counts per minute) dargestellt.

4.6 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die durchflusszytometrischen Messungen wurden am FACS CantoII (*Becton Dickinson*) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Programme *BD FACS DIVA Version 3.0* und *FlowJo10.0.8*.

Material

Fluo-Puffer

5 g Bovines Serum Albumin (BSA)¹²

50 mg Natrium Azid (NaN₃)¹

ad 500 ml PBS pH 7,2, Lagerung bei 4 °C

Normal-Mausserum: 1:20 in Fluo-Puffer

Lebend/Tot-Färbung: 7AAD (7-Actinomycin-D)¹

Primäre und sekundäre AK verdünnt in Fluo-Puffer

PBS

Bursa- und Milzleukozyten in Einzelzellsuspension (Präparation 4.2.2)

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden, wenn nicht anders angegeben, 5×10^5 Zellen auf einer 96-Lochplatte ausplattiert, auf ein Volumen von 200 µl Fluopuffer aufgefüllt und bei 716xg für eine Minute zentrifugiert. Das vorliegende Zellpellet wurde den Protokollen für die direkte und indirekte Färbung entsprechend bearbeitet siehe (4.6.3; 4.6.4 und 4.6.5.) Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sowie direktkonjugierte Antikörper werden in den Tabellen 6-8 aufgeführt. Die Inkubation der Zellen mit der Antikörperverschüttung fand stets auf Eis gekühlt und im Dunkeln statt. Als Kontrollen wurden für jede Färbung entsprechende Isotypkontrollen mitgeführt. Ein Waschschriff in der Vorbereitung für durchflusszytometrische Messungen bedeutet (wenn nicht gesondert beschrieben) das Resuspendieren der Zellen in 200 µl Fluopuffer nach einer Inkubation mit einem Färbantikörper und die nachfolgende Zentrifugation der Zellsuspension bei 716xg für eine Minute, sodass die Zellen wieder als Pellet vorliegen und erneut in einer Antikörperlösung oder in Fluopuffer resuspendiert werden können.

4.6.1 Primäre Antikörper

Antigen	Klon	Spezies	Isotyp	Konzentration	Referenz o. Hersteller
BAFF-R	2C4	Maus	IgG1	2 µg/ml	laborintern
CD40	AV79	Maus	IgG2a	1 µg/ml	8
L-Kette	2G1	Maus	IgG1	7,5 µg/ml	laborintern
CXCR4	9D9	Maus	IgG2a	2,5 µg/ml	[169]
CXCR5	6A9	Maus	IgG1	1 µg/ml	[169]
CD80	IAH:F864:DC7	Maus	IgG2a	1 µg/ml	16
MHCII	2G11	Maus	IgG1	0,5 µg/ml	9
Maus- CD8-α-Tag		Ratte	IgG2a	2,5mg/ml	25

Tabelle 7: In der Durchflusszytometrie eingesetzte primäre Antikörper

4.6.2 Sekundäre Antikörper

Name	Spezies	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
anti-muIgG1	Ziege	APC	1:1000	26
anti-muIgG1	Ziege	RPE	1:300	9
anti-muIgG2a	Ziege	AlexaFluor647	1:2000	5
anti-muIgG2a	Ziege	RPE	1:300	9
anti-muIgG2b	Ziege	APC	1:200	26
Streptavidin	Streptomyces avidinii	APC	1:1500	26

Tabelle 8: In der Durchflusszytometrie eingesetzte Sekundärantikörper

4.6.3 Indirekte Färbungen

Die pelletierten Zellen wurden in 50 µl der primären Antikörper-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Vor der zweiten Inkubation für 20 Minuten mit 40 µl der sekundären Antikörperverdünnung wurde zum Waschen 200 µl Fluopuffer zugegeben und erneut bei 716xg für eine Minute zentrifugiert. Zur Messung wurde das Zellpellet in 100 µl Fluopuffer aufgenommen und in ein mit 300 µl Fluopuffer beschichtetes Messröhrchen überführt.

Bei Mehrfachfärbungen mit Antikörpern unterschiedlichen Isotyps wurden die primären Antikörper in 50 µl einer gemeinsamen Lösung auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt. Auch die sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden in gemeinsamen Antikörperlösungen in einem Volumen von 40 µl auf die jeweilige Endkonzentration verdünnt hergestellt.

4.6.4 Direkte Färbungen mit Fluochrom-markierten Antikörpern

Die pelletierten Zellen wurden in 40 µl der verdünnten Antikörperlösung resuspendiert und für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Antigen	Klon	Isotyp	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller
chBu1(B6)	AV20	IgG1	RPE	1:100	9
chBu1(B6)	AV20	IgG1	FITC	1:300	laborintern
chBu1(B6)	AV20	IgG1	APC	1:500	laborintern
BAFF-R	2C4	IgG1	FITC	1:400	laborintern
chCD4	CT4	IgG1	FITC	1:1000	17
chCD8a	CT8	IgG1	RPE	1:1000	17

Tabelle 9: Durchflusszytometrisch verwendete direktkonjugierte Antikörper

4.6.5 Lebend/Tot-Färbung

Zur Diskriminierung zwischen lebenden und toten Zellen wurde 7-Actinomycin-D (7AAD) in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Hierzu wurden kurz vor Messung der Proben 10 µl der 7AAD-Stammlösung (200 µg/ml) in 400 µl Zellsuspensionsvolumen gegeben und die Proben 10-15min auf Eis im Dunkeln inkubiert.

4.6.6 Mehrfachfärbungen mit Antikörpern des gleichen Isotyps

Bei Mehrfachfärbungen mit Antikörpern des gleichen Isotyps wurde, wie in 4.6.3 beschrieben, die indirekte Färbung mit unkonjugiertem primärem und sekundärem Antikörper durchgeführt. Nach einem Waschschrift mit 200 µl Fluopuffer folgte ein Inkubationsschritt der Zellen in 40 µl Normal-Mausserum für 20 Minuten auf Eis zur Blockade der freien Bindungen. Nach einem weiteren Waschschrift mit 200 µl Fluo-Puffer, erfolgte die Färbung mit dem zweiten Antikörper des gleichen Isotyps als Direktkonjugat.

4.6.7 Färbung der Milzleukozyten mit dem Proliferationsfarbstoff *eFluor670*

Die Proliferation von stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten wurde durch Markierung der Zellen mit dem Proliferationsfarbstoff *eFluor670* im Durchflusszytometer quantifiziert. Durch Markierung der Zellen direkt nach Präparation mit *eFluor670* wird dieser in das Zytoskelett der Zellen eingelagert und bei jeder Zellteilung gleichmäßig auf die Tochterzelle übertragen, sodass sich deren Fluoreszenz halbiert. Durch Färbung der Zellen mit spezifischen Markern ist es möglich die sich teilenden Zellpopulationen zu unterscheiden.

Material

***eFluor670*¹⁵-Stocklösung:** 5 μ M in PBS

Milzlymphozyten

Durchführung

Nach Gewinnung der primären Milzleukozyten durch Dichtezentrifugation (siehe 4.2.2) wurde sofort im Anschluss die Markierung mit dem Proliferationsfarbstoff *eFluor670* durchgeführt. Dazu wurde die benötigte Zellzahl in ein 15 ml-Röhrchen überführt und bei 225xg für 1 Minute bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und pro 1×10^7 Zellen je 1 ml *eFluor670*-Arbeitslösung in einer Konzentration von 5 μ M zugegeben und resuspendiert. Die Zellen wurden im Probenröhrchen im Wasserbad bei 37 °C für zehn Minuten im Dunkeln inkubiert und nach 5 Minuten für 10 Sekunden auf dem Schüttler aufgewirbelt, um eine gleichmäßige Verteilung des Farbstoffes zu gewährleisten. Im ersten Waschschrift wurde das Probenröhrchen mit warmem FBS-haltigem Standardmedium aufgefüllt, um die Färbereaktion abzustoppen. Nach erneuter Zentrifugation bei 225xg für 10 Minuten bei RT wurde das nun sichtbar bläulich gefärbte Zellpellet in 5 ml warmem RPMI resuspendiert, in ein 50 ml-Röhrchen überführt und mit RPMI auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Nach diesem dritten Waschschrift erfolgte die letzte Zentrifugation bei 225xg für 10 Minuten bei RT, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Hühnerleukozyten-Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Die APC-Fluoreszenz der Zellen wurde durchflusszytometrisch kontrolliert und die erfolgreich markierten Zellen in Kultur genommen.

4.6.8 Zellzahl-Quantifizierung mittels Beads

Material

Stimulierte Bursa- und Milzleukozyten in Einzelzellsuspension

123count ebeads¹⁵

Durchführung

Für die durchflusszytometrischen Färbungen wurde aus den Stimulationsansätzen der 96-Flachlochplatte nach mehrmaligem Aufsuspendieren 100 µl Zellsuspension pro well entnommen und entsprechend dem Färbeprotokoll (siehe 4.6.4) behandelt. Zu den fertigen Proben wurde pro Messröhrchen 50 µl *123count ebeads* zugegeben. Diese wurden zuvor zweimal für 30 Sekunden auf dem Schüttler aufgewirbelt, um Dublettenbildung der Beads zu minimieren. Ebenso wurden die Proben-Beadmischungen direkt vor Messung im Durchflusszytometer nochmals gründlich aufgewirbelt. Um Zellverluste durch Pipettierschritte zu vermeiden, wurden diese auf ein Minimum reduziert und alle Proben der exakt gleichen Prozedur unterzogen.

Die Laser des Durchflusszytometers wurden so eingestellt, dass die Beads im FITC versus PE Kanal dargestellt werden konnten. Je Probe wurden 10.000 Beads gezählt. Zur Auswertung der absoluten B- und T-Zellzahlen pro Stimulation wurde das Programm *FlowJO* benutzt und die Zellzahl mithilfe der Formel:

Absolute Zellzahl = gezählte lebende Zellpopulation x zugefügte Beads / gezählte Beads berechnet.

4.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Ergebnisse aus den biologischen Testverfahren erfolgte mit Microsoft® Excel 2010 für Windows. Die statistischen Unterschiede der Gruppenmittelwerte wurden mittels Anova SPSS überprüft.

Grafiken wurden mit GraphPad Prism® von GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA oder mittels Microsoft® Power Point 2010 angefertigt.

Zur besseren Lesbarkeit wurden Tausendertrennpunkte verwendet.

5 ERGEBNISSE

Aus früheren Arbeiten unserer Forschungsgruppe ist bekannt, dass CD40L die Proliferation von Hühner-B-Lymphozyten fördert, sowie die Zahl lebender B-Zellen nach Kultivierungszeit steigert [101]. Bei verschiedenen Säuger-Spezies (Mensch, Maus und Schwein) wurde für BAFF, IL10 und IL21 synergistische Wirkungen bei Kostimulation mit CD40L auf die B-Zellbiologie festgestellt. Ob dies auch für das B-Zellsystem des Huhns gilt, sollte mit verschiedenen Versuchsansätzen der stimulierten Hühner-Lymphozytenkulturen aus Bursa und Milz untersucht werden.

5.1 EINFLUSS VON CD40L, BAFF, IL10 UND IL21 AUF DIE LYMPHOZYTENZAHL

In einem ersten Versuchsansatz wurde der Einfluss der Zytokine CD40L, BAFF, IL10 und IL21 auf die absolute Anzahl lebender B-Zellen nach Kultivierungszeit in Bursa- und Milzzellkulturen untersucht. Hierzu wurden Bursa- und Milzlymphozyten in den angegebenen Zytokinkombinationen kultiviert und danach durchflusszytometrisch analysiert. Zur Diskriminierung der lebenden Zellen erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung mit 7AAD. Zur Färbung der B-Zellen wurde der Marker Bu1 verwendet. In Milzlymphozytenkulturen wurde zusätzlich die Anzahl CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen bestimmt (nicht dargestellt). Durch Zugabe von fluoreszierenden Beads konnte die Anzahl lebender Zellen quantifiziert werden (Durchführung siehe 4.6.8). Abbildung 6 zeigt in A) die Anzahl lebender B-Lymphozyten in Zytokinkombinationen mit BAFF, IL10 und IL21 ohne die Kostimulation durch CD40L in B) sind die Zahlen lebender B-Lymphozyten in allen Kombinationen mit CD40L dargestellt. Je Stimulationsansatz wurden 5×10^5 Bursalymphozyten und $2,5 \times 10^5$ Milzlymphozyten in einer 96-Flachlochplatte in einem Volumen von 200 µl ausgesäht. Bursalymphozyten verblieben für 24 h in Kultur, Milzlymphozyten dagegen für 48 h. Diese unterschiedlichen Kultivierungszeiten und Zellzahlen wurden in Vorversuchen etabliert, um die Ergebnisse zwischen den Organen besser vergleichen zu können. Betrachtet man die Stimulation mit CD40L in den organspezifischen Lymphozytenkulturen resultieren nach 24 h in Bursazellkulturen und nach 48 h in Milzzellkulturen ähnliche Zellzahlen, so dass die Ergebnisse gut verglichen werden können.

Durch Kultivierung der Lymphozyten in Zytokin-Mediummischungen erhöhte sich die B-Lymphozytenzahl gegenüber der zur Kontrolle in Medium allein kultivierten Bursa- und Milzlymphozyten, welche rasch abstarben und auf wenige Prozent (1-5 %) der Ausgangszahl reduziert wurden.

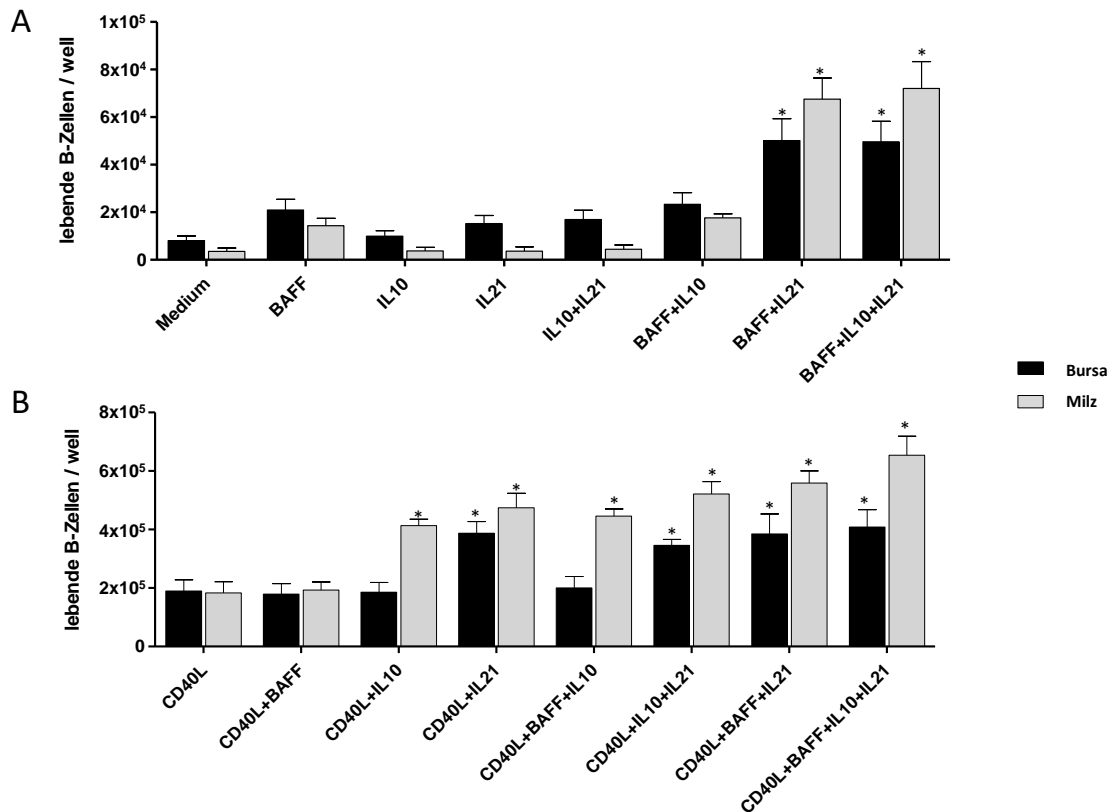


Abbildung 6: Absolute Anzahl lebender B-Zellen in mit CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimulierten Bursa- und Milzzellkulturen

Nach Kultivierung in A) Zytokinkombinationen ohne CD40L und B) mit CD40L wurden Bursa- und Milzlymphozyten mit dem Marker Bul gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die absolute Zellzahl pro Lymphozytensubpopulation wurde durch Zugabe fluoreszierender Beads quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm STABW von drei 8 Wochen alten Hühnern. Pro Tier wurden technische Duplikate angesetzt. Die statistische Signifikanz ist in A) gegenüber Medium-kultivierten Lymphozyten in B) gegenüber CD40L-kultivierten Lymphozyten mit $*p < 0,05$ gekennzeichnet.

Um die Effektstärke der Zytokine auf die verbleibenden lebenden B-Zellzahlen in den Kulturen darzustellen wurde der Lebend-Tot-Index (LT-Index) berechnet, indem die Zahl lebender B-Zellen je Stimulation durch die Anzahl lebender B-Zellen im Kontrollansatz mit Medium ohne Zytokine geteilt wurde. Definitionsgemäß ist der LT-Index für die Kultivierung von Lymphozyten in Medium gleich 1.

Lebend-Tot-Index		
Stimulation	Bursa	Milz
Medium	1±0	1±0
CD40L	25±4	70±8
BAFF	3±0	5±1
IL10	1±0	1±0
IL21	2±0	1±0
IL10+IL21	2±0	1±0
BAFF+IL10	3±0	8±2
BAFF+IL21	7±1	29±5
BAFF+IL10+IL21	7±2	30±4
CD40L+BAFF	24±5	81±12
CD40L+IL10	25±6	195±48
CD40L+IL21	55±22	215±49
CD40L+BAFF+IL10	26±0	215±55
CD40L+IL10+IL21	50±22	236±50
CD40L+BAFF+IL21	52±13	255±55
CD40L+BAFF+IL10+IL21	56±16	302±72

Tabelle 10: Lebend-Tot-Index der in kultivierte Lymphozyten aus Bursa und Milz

Dargestellt sind die LT-Indices (Zellzahl Stimulation/Zellzahl im Medium) der in Zytokinkombinationen stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten. Angegeben sind Mittelwerte±STABW dreier 8 Wochen alter Hühner.

Die zur Kontrolle in Medium ohne Zytokinzusätze kultivierten Lymphozyten starben rasch ab und waren nach 24 h in Bursazellkulturen auf 1 % der ursprünglich eingesetzten Lymphozytenzahl dezimiert. In Milzkulturen waren nach 48 h noch 5 % der ursprünglich eingesetzten Lymphozyten vorhanden. IL10 und IL21 alleine wirkten sich nicht auf die lebende B-Zellzahl nach Kultivierung aus und zeigten keinen synergistischen Effekt.

BAFF konnte die Anzahl der lebenden B-Milzlymphozyten um das 5-fache, die Anzahl der Bursalymphozyten um das 3-fache steigern im Vergleich zur Kultivierung in Medium allein.

Interessanterweise zeigte sich BAFF mit IL21 synergistisch und führte zu einer 7-fach erhöhten B-Zellrate in Bursakulturen. In der Milz war dieser Effekt mit durchschnittlich 30-facher Steigerung vielfach stärker ausgeprägt. In Milzlymphozyten zeigte auch BAFF mit

IL10 einen synergistischen Effekt und erhöhte die B-Zellrate 10-fach gegenüber der Mediumkontrolle, in der Bursa nur 3-fach.

Auch die Wirkung von CD40L allein zeigte sich mit einer 70-fachen Erhöhung der B-Zellzahl in Milzzellkulturen stärker ausgeprägt, als die 25-fache Erhöhung der B-Zellzahlen in Bursazellkulturen.

CD40L zeigte sich in beiden Organkulturen synergistisch auf die Erhöhung der B-Zellzahl nach Kultivierung. Alle Zytokinkombinationen mit CD40L führten in Bursalymphozytenkulturen zu einer mindestens 25-fachen (für die Kombinationen CD40L+BAFF, CD40L+IL10, CD40L+BAFF+IL10) bis 50-fachen Steigerung (für die Kombinationen CD40L+IL21, CD40L+IL21+BAFF) der B-Zellzahl pro Stimulationsansatz im Vergleich zur Mediumkontrolle. Dabei zeigten in der Bursa CD40L+IL21 den größten Effekt auf die Erhöhung lebender B-Lymphozyten. Die Zugabe von BAFF konnte die lebende B-Lymphozytenzahl nicht weiter steigern, obwohl die Stimulation bursaler B-Zellen mit BAFF allein auf Bursalymphozyten den größeren Effekt zeigt.

In Milzzellkulturen konnten die lebenden B-Zelllymphozyten um das 200-fache gesteigert werden, die gemessene Zahl lebender B-Zellen in Milzzellkulturen war mit 4×10^5 (CD40L+BAFF, CD40L+IL10, CD40L+IL21) bis 6×10^5 (CD40L+IL10+IL21, CD40L+BAFF+IL21, CD40L+BAFF+IL21+IL10) Zellen pro Ansatz in der Kombination aus allen verwendeten Zytokinen zusammen höher als für Lymphozytenkulturen der Bursa.

Die weitere Zugabe von BAFF konnte im Gegensatz zu Bursalymphozyten die Anzahl lebender B-Zellen in Kultur zur Kostimulation mit CD40L+IL10 und CD40L+IL21 gering erhöhen.

Mit diesem Versuchsansatz konnte gezeigt werden, dass bei Kostimulation mit CD40L durch Zugabe von IL10 (Milz) und IL21 (Milz und Bursa) die Zahl lebender B-Zellen in Kultur durch Synergie-Effekte der Zytokine deutlich steigerbar ist.

5.2 EINFLUSS VON CD40L, BAFF, IL10 UND IL21 AUF DIE PROLIFERATION VON LYMPHOZYTEN

Zunächst wurden hierzu Proliferationsassays mit [^3H]-Thymidin durchgeführt. Dazu wurden Bursa- und Milzlymphozyten wie in 4.5 beschrieben mit CD40L, BAFF, IL10 und IL21 einzeln und in Kombination stimuliert und nach einer Kultivierungszeit von 24 h für Bursa- und 48 h für die Milzzellkulturen durch Zugabe von [^3H]-Thymidin für weitere 16 h gepulst.

5.2.1 Lymphozytenproliferation im [^3H]-Thymidin-Assay

In Vorversuchen mit verschiedenen Zellzahlen und Kultivierungszeiten, hat sich die unterschiedliche Kultivierungszeit für Bursa- und Milzlymphozyten mit der ausgewählten Zellzahl bewährt. Als unstimulierter Kontrollansatz wurden Bursa- und Milzlymphozyten in Medium ohne Zytokinzusätze kultiviert, dabei wurde für Bursalymphozyten eine niedrige basale Countrate von durchschnittlich 200 cpm detektiert, für Milzlymphozyten eine etwas höhere Rate von knapp 3.000 cpm. Der biologische Effekt der rekombinant hergestellten Zytokine wurde in früheren Arbeiten hinreichend belegt [101, 102, 122, 166], sodass auf einen Stimulationsansatz mit einem biologisch funktionslosen Kontrollprotein verzichtet werden konnte.

5.2.1.1 Einfluss von BAFF, IL10, IL21 auf die Proliferation

Zytokinkombinationen ohne die Kostimulation durch CD40L induzierten niedrigere Countraten als mit CD40L und sind mit einer angepassten Achsenskala in Abbildung 7 dargestellt.

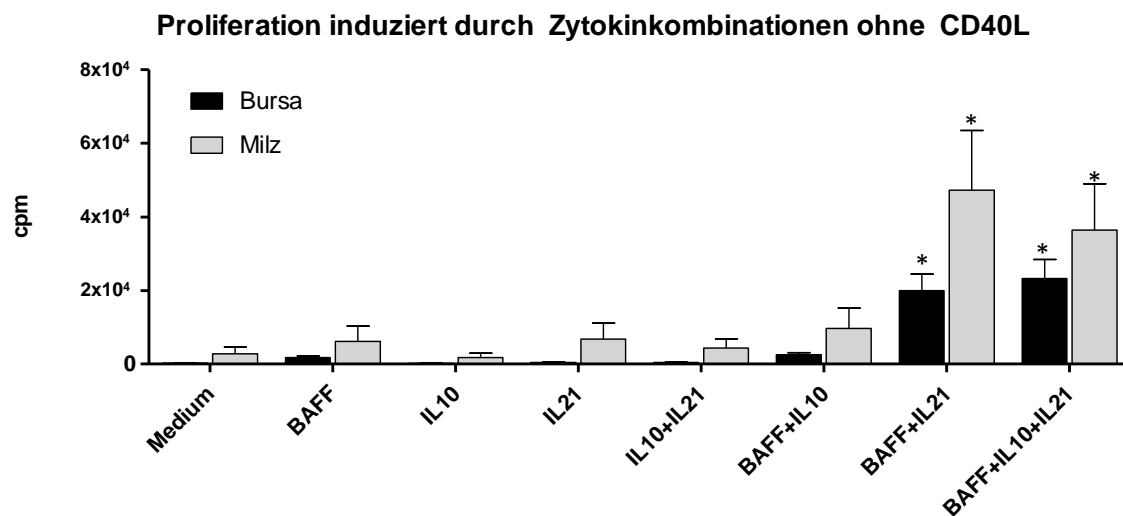


Abbildung 7: Durch BAFF, IL10 und IL21 induzierte Proliferation

Proliferationsraten von Bursa- und Milzlymphozyten nach 24 h (Bursa schwarze Balken) bzw. 48 h (Milz graue Balken) unter Einfluss der Zytokinen IL10, IL21 und BAFF. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente (MW+STABW) von drei 8 Wochen alten Hühnern. Die statistische Signifikanz gegenüber Medium-kultivierten Lymphozyten ist mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Für das Zytokin IL10 allein konnte kein proliferativer Effekt nachgewiesen werden. IL21 allein induziert in der Milz niedrige Proliferationsraten. In Ansätzen mit BAFF wurden geringgradige Proliferationsraten in Milzlymphozytenkulturen gemessen. Äußerst interessant ist, dass BAFF+IL21 als einzige Kombination ohne Kostimulation mit CD40L in Lymphozytenkulturen beider Organe eine mittlere Proliferationsrate von durchschnittlich 20.000 cpm induziert.

5.2.1.2 Einfluss der Zugabe von CD40L auf die Proliferation

Abbildung 8 zeigt die induzierte Proliferationsrate der Stimulationsansätze von Bursa- und Milzlymphozyten mit Zytokinkombinationen in Anwesenheit von CD40L nach 24 h (Bursa) bzw. 48 h (Milz).

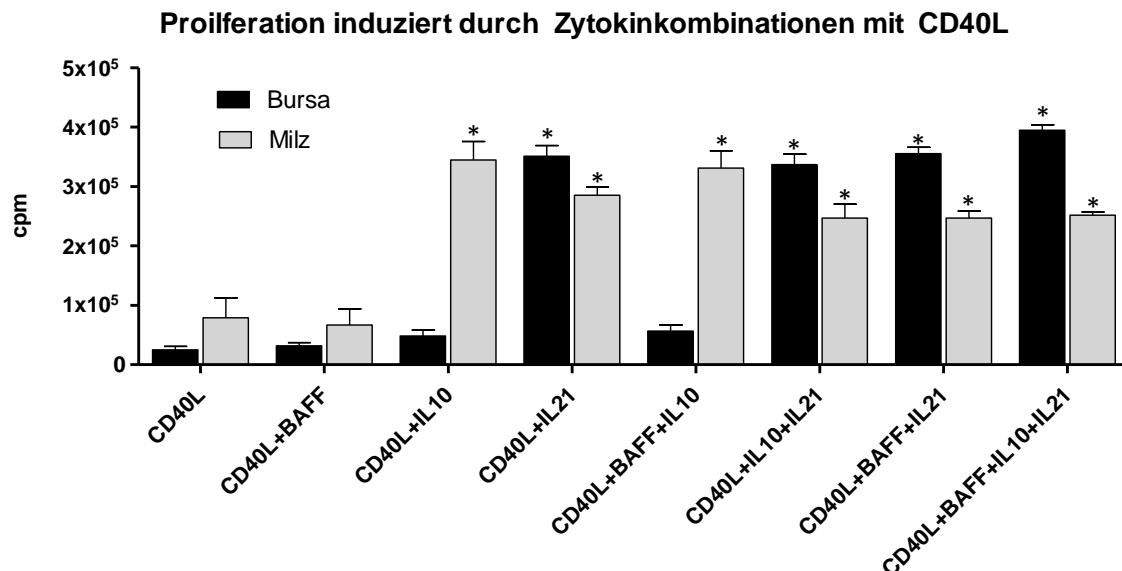


Abbildung 8: Einfluss der Zytokinkombinationen mit CD40L auf die Proliferation von Lymphozyten

Proliferationsraten von Bursa- und Milzlymphozyten nach 24 h (Bursa schwarze Balken) bzw. 48 h (Milz graue Balken) unter Einfluss von CD40L, bzw. Kombinationen aus CD40L und den Zytokinen IL10, IL21 und BAFF. Dargestellt sind drei unabhängige Experimente (MW+STABW) von drei 8 Wochen alten Hühnern. Die statistische Signifikanz gegenüber CD40L-kultivierten Lymphozyten ist mit * $p < 0,05$ gekennzeichnet.

Die Stimulation mit CD40L induzierte in Bursalymphozyten eine mittlere Proliferationsrate von ca. 25.000 cpm, in Milzlymphozyten etwa 80.000 cpm. Der proliferative Effekt von CD40L war durch die Zugabe von IL21 in Bursakulturen und in Milzzellkulturen durch IL10 und IL21 deutlich steigerbar. Die höchsten Proliferationsraten in Bursalymphozytenkulturen wurden durch den Synergismus von CD40L+IL21 (350.000 cpm) hervorgerufen. Auch in Milzzellkulturen induzierte die Kombination CD40L+IL21 eine sehr hohe Proliferationsrate von durchschnittlich 280.000 cpm und war durch Zugabe von BAFF und IL10 nicht weiter steigerbar. Allerdings war in der Milz auch die Kombination von CD40L+IL10 in der Lage, eine maximale Proliferation der Zellen zu induzieren (340.00 cpm), was die Wirkung dieser Kombination auf Bursalymphozyten um ein Vielfaches übertraf. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass für die Bursa der proliferative Effekt, der durch die Kombination aus CD40L+IL21 induziert, wurde dem Maximum entsprach und eine Zugabe von weiteren Zytokinen keine Steigerung der Proliferationsrate bewirkte; in der Milz konnte die maximale Proliferation hingegen sowohl durch CD40L+IL21 als auch durch CD40L+IL10 induziert werden.

Die Zugabe von BAFF zur CD40L Stimulation dagegen, ergab weder in Bursa- noch in Milzlymphozytenkulturen eine Steigerung der mit CD40L bzw. CD40L-Zytokinkombinationen induzierten Proliferation.

5.2.1.3 Effektstärke der Zytokine auf die Proliferation

Um die Effektstärke der Zytokine im Zusammenspiel der Zytokinwirkungen auf Bursa- und Milzlymphozyten besser vergleichen zu können, wurde der Proliferationsindex (PI) berechnet und in Tabelle 11 dargestellt. Hierbei wurden die Werte der Stimulationen durch den Mediumwert geteilt. Stimulierte Bursalymphozytenkulturen erzielten per se höhere Proliferationsindices, da die basale Countrate für in Medium allein kultivierten Bursalymphozyten deutlich niedriger war als der Mediumwert für Milzlymphozyten.

Proliferationsindex		
Stimulation	Bursa	Milz
Medium	1±0	1±0
CD40L	120±29	42±28
BAFF	8±2	2±0
IL10	1±1	1±0
IL21	2±1	3±0
IL10+IL21	2±1	2±0
BAFF+IL10	12±2	4±1
BAFF+IL21	94±19	28±18
BAFF+IL10+IL21	110±22	21±13
CD40L+BAFF	151±21	37±26
CD40L+IL10	231±45	250±17
CD40L+IL21	1720±121	210±29
CD40L+BAFF+IL10	272±35	248±25
CD40L+IL10+IL21	1652±119	198±60
CD40L+BAFF+IL21	1750±183	196±20
CD40L+BAFF+IL10+IL21	1960±298	195±32

Tabelle 11: Proliferationsindex der stimulierten Lymphozyten

Dargestellt sind die Proliferationsindices der mit Zytokinkombinationen stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten. Angegeben sind die Mittelwerte ±STABW dreier 8 Wochen alter Hühner.

Die Zytokine IL10, IL21 allein oder deren Kombination zeigten keinen proliferativen Effekt auf die kultivierten Lymphozyten aus Bursa und Milz. Die Stimulation mit BAFF und die Kombination BAFF+IL10 induzierten geringgradige Proliferation auf Bursalymphozyten und Milzlymphozyten. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von IL21 zur Stimulation von BAFF, kommt es zum Synergismus der beiden Zytokine, wodurch auch ohne die Kostimulation mittels CD40L ein mittleres Proliferationsniveau induziert wurde. CD40L allein erzeugt in

der Bursa ein mittleres Proliferationsniveau mit einem PI von 120 und in der Milz von 42. Maximale Proliferation wurde in Bursa- und Milzlymphozyten für alle Kombinationen, bei denen mindestens CD40L+IL21 eingesetzt wurden detektiert, in kultivierten Milzlymphozyten zusätzlich die beiden Kombinationen mit CD40L+IL10. Dabei ist der synergistische Effekt der Zytokine in der Proliferation induzierenden Wirkung auf Bursalymphozyten viel höher mit einer 14-fach Steigerung für CD40L+IL21 im Gegensatz zur 5-fachen Steigerung der Proliferationsrate für Milzlymphozyten.

5.2.2 Lymphozytenproliferation im Proliferationsassay mit *eFluor670*

Im Fokus dieser Arbeit stehen die B-Zellen des Haushuhns. Aufgrund der Tatsache, dass es sich in der Milz um eine gemischte Lymphozytenpopulation handelt (siehe Tabelle 12), kann durch die beschriebenen Versuche mit radioaktiv gepulsten gesamten Milzlymphozyten nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere durch CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimulierbare Zellen zur Proliferation angeregt wurden.

	Bu1	CD4	CD8
Milz	32,1±5	16,5±4	31,7±7

Tabelle 12: B- und T-Zellfrequenz der Milz vor Beginn der Kultivierung

Milzleukozyten wurden nach Präparation durch Dichtezentrifugation gegen Bu1, CD4 und CD8 gefärbt und die B- und T-Zellfrequenz (CD4⁺ oder CD8⁺) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Tabelle zeigt Mittelwerte in Prozent ±STABW von fünf Tieren im Alter zw. 8 und 12 Wochen.

5.2.2.1 Charakterisierung Zytokin-stimulierten proliferierenden Milzlymphozyten

Um zu untersuchen, welche Zellen unter den ausgewählten Zytokineinflüssen proliferieren, wurde in dieser Arbeit der Proliferationsfarbstoff *eFluor670* eingesetzt. Die Zellen wurden vor Stimulationsbeginn mit *eFluor670* markiert, der im Falle von Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzelle weitergegeben wird. Diese Fluoreszenzabnahme der markierten Milzlymphozyten wurde durchflusssytometrisch erfasst und ausgewertet.

Zunächst sollte bestimmt werden aus welchen Subpopulationen sich die stimulierten Lymphozyten zusammensetzen.

5.2.2.2 B- und T (CD4⁺ oder CD8⁺)-Zellfrequenz in den mit CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimulierten Milzzellkulturen

Um die B- und T-Zellzusammensetzung pro Stimulationsansatz nach Kultivierung zu quantifizieren wurde das Gating in Abbildung 9 angewendet.

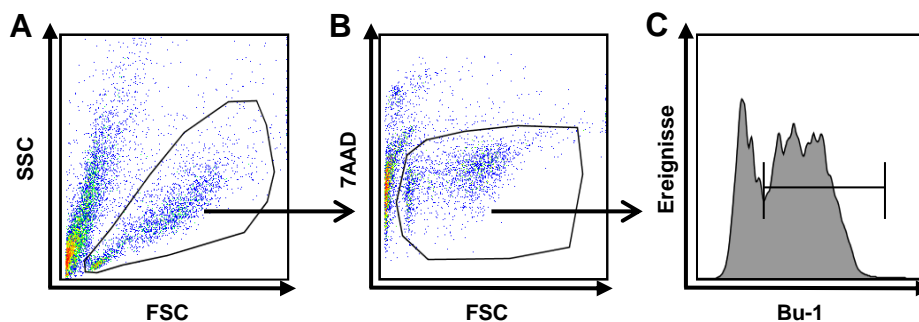


Abbildung 9: Gatingstrategie zur Bestimmung der B- und T-Zellfrequenz in stimulierten Milzlymphozyten
In Messfenster A wurden die Lymphozyten umrahmt, in B wurden durch die Lebend-Tot Färbung mit 7AAD die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen. C zeigt die Markersetzung auf Bu1 positive Zellen der lebenden Population.

Die durchschnittliche Frequenz der B- und T-Zellpopulation nach 48 h Zytokinstimulation für die Milzlymphozyten dreier Tiere im Alter von 8-10 Wochen ist in Tabelle 13 dargestellt.

Stimulationsansatz	Zellzusammensetzung (%)		
	B-Zellen	CD4 ⁺ -T-Zellen	CD8 ⁺ -T-Zellen
Medium	23±4	17±7	7±5
CD40L	65±9	12±4	8±7
BAFF	45±10	13±7	6±2
IL10	32±4	26±2	11±4
IL21	35±3	20±8	9±6
IL10+IL21	43±11	22±9	9±7
BAFF+IL10	48±2	15±5	6±5
BAFF+IL21	67±13	8±3	5±4
BAFF+IL10+IL21	72±15	8±3	6±5
CD40L+BAFF	68±6	10±2	7±6
CD40L+IL10	86±4	4±1	2±0
CD40L+IL21	89±2	3±1	5±2
CD40L+BAFF+IL10	83±6	6±3	4±4
CD40L+IL10+IL21	90±3	2±1	4±1
CD40L+BAFF+IL21	92±1	3±1	5±3
CD40L+BAFF+IL10+IL21	91±3	3±1	4±2
Con A	31±1	26±2	25±4

Tabelle 13: B- und CD4⁺ und CD8⁺-T-Lymphozytenfrequenz nach 48 h in Milzkulturen

Milzleukozyten wurden nach Kultivierung in Zytokinhaltigem Medium gegen Bu1, CD4 und CD8 gefärbt und die B- und T-Zellfrequenz (CD4⁺ oder CD8⁺) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Tabelle zeigt Mittelwerte ±STABW von drei Tieren im Alter zw. 8-10 Wochen.

Die lebende Population in Medium ohne Zytokinzusätze kultivierter Milzlymphozyten bestand aus 23 % Bu1 positiven Zellen 17 % CD4 und 7 % CD8 positiven Zellen.

Zur Kontrolle der T-Zellproliferation wurde Con A eingesetzt. Die Con A stimulierten Milzlymphozyten bestanden nach 48 h aus 26% CD4⁺- und 28% CD8⁺-positiven T-Zellen, deren B-Zellfrequenz betrug 31 %.

Die Zugabe von IL10 und IL21 zu Milzzellkulturen allein hielt die B-Zellfrequenz auf dem Ausgangswert vor Kultivierung von ca. 30 %. In Kombination zeigten sich die beiden Zytokine synergistisch und erhöhten die B-Zellfrequenz im Vergleich zur Mediumkultivierung um das 1,8-fache. Unter Anwesenheit von BAFF erhöhte sich die B-Zellfrequenz ebenfalls um das 1,9-fache auf durchschnittlich 45 %. Dagegen wirkte BAFF mit IL10 nicht synergistisch, so dass die B-Zellfrequenz annähernd auf dem Niveau (48 %) der Stimulation von BAFF allein blieb. Hervorzuheben ist die Kombination von BAFF+IL21. Hier erhöht das Zusammenspiel zwischen BAFF und IL21 ohne Kostimulation durch CD40L

die B-Zellfrequenz auf 67 % Bu1 positive Zellen, dem 2,9-fachen verglichen zur Mediumkultivierung. Dies entspricht dem deutlichen Anstieg der B-Zellfrequenz, die durch Anwesenheit von CD40L (65%) detektiert wurde.

Nahezu reine B-Zellkulturen (über 90 % Bu1 positive Zellen) wurden in Kombinationen mit mindestens CD40L+IL21 und bei Zugabe von BAFF oder IL10 zu CD40L+IL21 gemessen. Der bis zu 4-fache Anstieg der B-Zellfrequenz gegenüber in Medium kultivierten Milzlymphozyten belegt, dass auch in mit CD40L und CD40L-Kombinationen stimulierten Milzlymphozytenkulturen hauptsächlich B-Zellen vorhanden waren.

5.2.2.3 Identifizierung der proliferierenden Zellpopulationen

In der weiteren Auswertung der Daten wurde nun die proliferierende Zellpopulation ($=eFluor_{low}$) bezüglich ihrer Zugehörigkeit zu B- oder T ($CD4^+/CD8^+$)- Zellpopulation analysiert, eine Übersicht ist in Tabelle 14 dargestellt. Das Gating erfolgte wie in Abbildung 10 dargestellt.

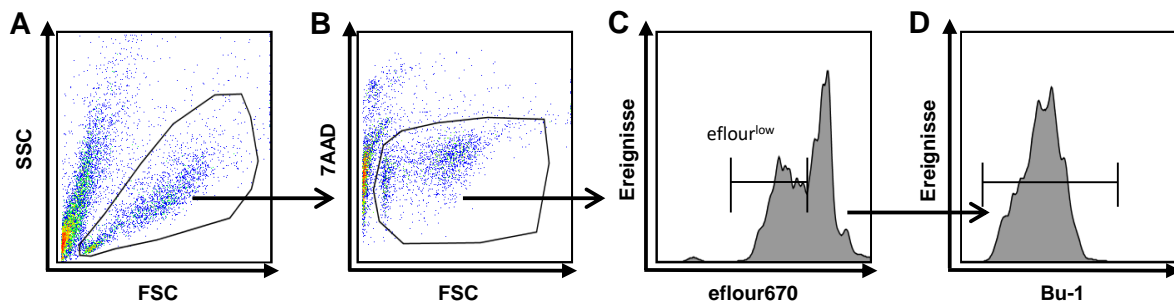


Abbildung 10: Gatingstrategie zur Bestimmung der B- und T-Zellfrequenz der $eFluor_{low}$ Zellpopulation

In Messfenster A wurden die Lymphozyten umrahmt, in B wurden durch die Lebend-Tot-Färbung mit 7AAD die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen. C zeigt die Markersetzung auf proliferierende Zellen mit niedrigerer $eFluor670$ Fluoreszenz ($eFluor_{low}$ Population). Von diesen wurde in D die Marker positive Population (hier Bu1) bestimmt.

Stimulationsansatz	Proliferierende Zellen (% von Gesamt)	Zusammensetzung der <i>eFluor670_{low}</i> Population (% von <i>eFluor670_{low}</i>)		
	<i>eFluor670_{low}</i>	B-Zellen	CD4 ⁺ -T-Zellen	CD8 ⁺ -T-Zellen
Medium	12±9	8±2	7±3	2±2
CD40L	40±15	91±5	5±2	1±0
BAFF	13±8	30±19	6±2	3±1
IL10	8±2	21±6	6±4	7±7
IL21	14±4	14±7	5±1	14±9
IL10+IL21	16±8	16±6	5±1	17±11
BAFF+IL10	19±5	69±8	4±1	1±0
BAFF+IL21	51±9	75±5	1±0	2±1
BAFF+IL10+IL21	53±11	82±4	1±1	2±1
CD40L+BAFF	41±8	95±1	3±1	1±0
CD40L+IL10	76±2	92±7	1±0	0±0
CD40L+IL21	84±5	97±1	1±0	1±1
CD40L+BAFF+IL10	72±10	97±1	1±0	0±0
CD40L+IL10+IL21	85±5	99±1	0±0	1±1
CD40L+BAFF+IL21	73±12	97±1	1±1	1±1
CD40L+BAFF+IL10+IL21	78±15	98±1	0±0	1±1
Con A	26±8	12±4	64±1	18±2

Tabelle 14: Anteil und Zusammensetzung der proliferierenden Zellen (*eFluor_{low}*) pro Stimulationsansatz

12 % der in Medium ohne Zytokinzusätze kultivierten Milzlymphozyten proliferierten wahrscheinlich unspezifisch und bestanden aus 8 % B-Zellen, 7 % CD4⁺- und 2 % CD8⁺-T-Zellen.

Dass im etablierten Kultursystem auch T-Zellen zur Proliferation angeregt werden konnten, zeigte die Stimulation mittels ConA. Hier bestand die proliferierte Zellpopulation aus 64% CD4⁺-Zellen, 18 % CD8⁺-Zellen und zu 12 % aus B-Zellen. Unter Anwesenheit von BAFF allein besteht die proliferierte Population zu 30 % aus B-Zellen. Die Zugabe von IL21 zur Stimulation mit BAFF zeigte einen starken synergistischen Effekt durch die Erhöhung des B-Zellanteils an der proliferierten Population auf 75 %.

Bei Anwesenheit von CD40L setzte sich die geteilte Zellpopulation aus 91 % B-Lymphozyten zusammen, CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sind mit unter 5 % in geringer Anzahl nachweisbar. Die B-Zellfrequenz der proliferierten Population stieg durch Zugabe weiterer Zytokine zur CD40L Stimulation auf bis zu 98 %.

5.2.2.4 Anteil proliferierender B-Zellen an der gesamten B-Zellpopulation

Um zu untersuchen, ob die gesamte B-Zellpopulation auf Signale durch die Zytokinstimulation hin proliferierten, oder nur Subpopulationen wurden die Zellen wie in Abbildung 11 gezeigt analysiert.

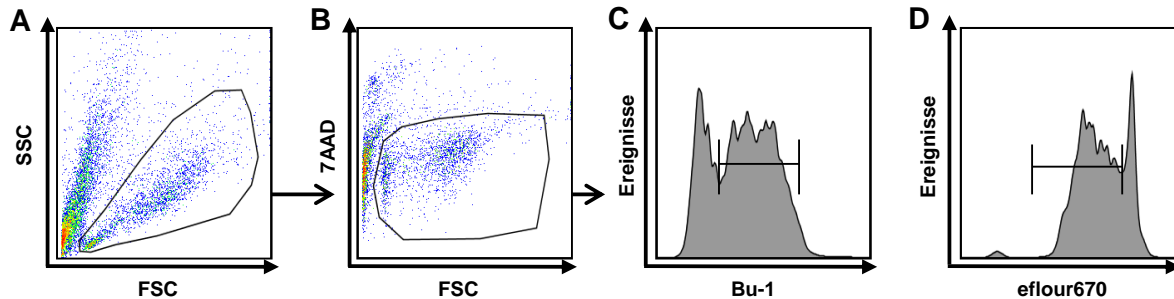


Abbildung 11: Gatingstrategie zur Bestimmung des proliferierenden B-Zellanteil an der gesamten B-Zellpopulation

Zur durchflusszytometrischen Analyse des prozentualen Anteils der proliferierten B-Zellen an der gesamten B-Zellpopulation, wurde nach dem LT-Gate ein Marker für die Bu1 positiven Zellen gesetzt. Danach wurde die abnehmende *eFluor670* Fluoreszenz der proliferierten Bu1 positiven Zellen bestimmt. Dargestellt ist eine exemplarische, von mehr als fünf unabhängigen, Untersuchung eines Huhns im Alter von 10 Wochen.

Abbildung 12 zeigt den prozentualen Anteil der proliferierenden B-Zellen an der gesamten B-Zellpopulation.

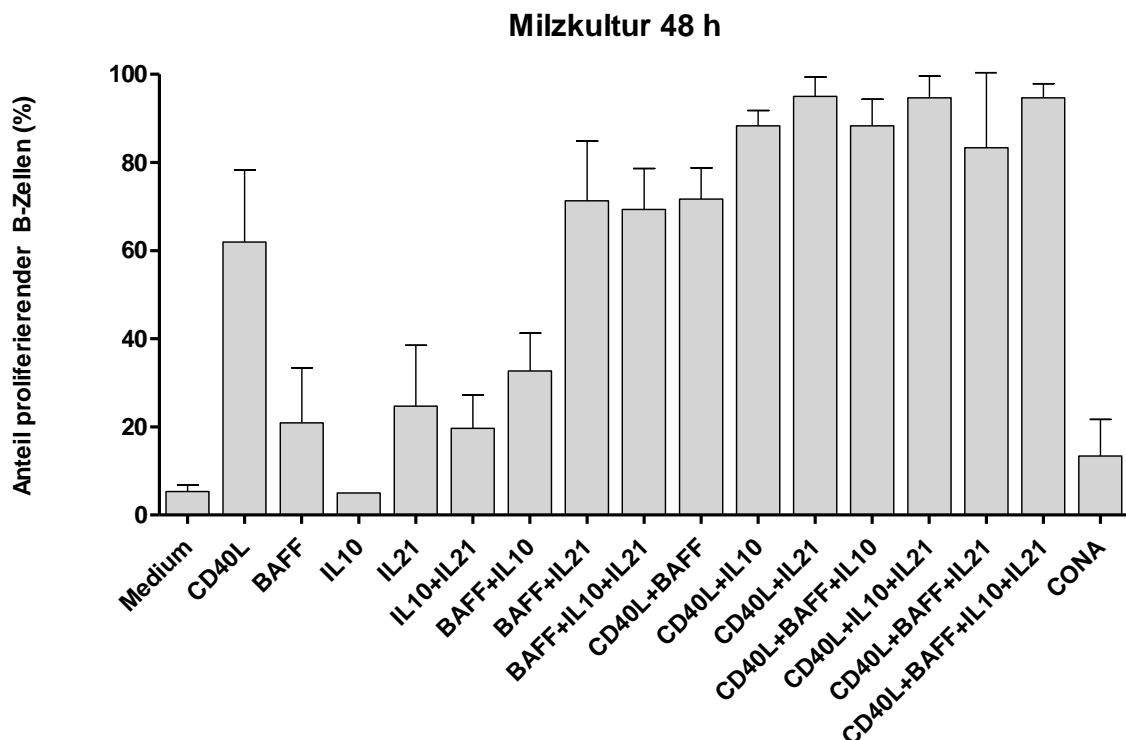


Abbildung 12: Anteil proliferierender B-Zellen an gesamter B-Zellpopulation

Aus *eFluor670* markierten Milzlymphozytenkulturen wurde durchflusszytometrisch der Anteil proliferierender B-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte +STABW dreier unabhängiger Experimente mit Hühnern im Alter von 8-10 Wochen.

Wie Abbildung 8 zeigt, proliferierten 5 % der zur Kontrolle in Medium ohne Zytokinzusätze kultivierten B-Lymphozyten aus der Milz. Bei alleiniger Gegenwart von BAFF oder IL21 zeigte sich ein 4-facher Anstieg (21 %) der proliferierenden B-Lymphozyten in Milzzellkulturen.

Die Zugabe von IL21 zur Stimulation mit BAFF zeigte einen synergistischen Effekt und erhöhte den Anteil proliferierender B-Zellen auf 71 %. Die Zugabe von IL10 zu BAFF+IL21 ergab keine weitere Steigerung des proliferierenden B-Zellanteils.

IL10+IL21 gemeinsam zeigte keinen synergistischen Effekt auf die Proliferationsrate von B-Zellen in Milzzellkulturen.

CD40L allein führte zu einer Proliferation von 62 % der B-Zellpopulation. Die Zugabe von BAFF erhöhte die Anzahl proliferierender B-Zellen auf 72 %.

Der stark synergistische Effekt zwischen CD40L und IL21 wird dadurch sichtbar, dass sich fast alle B-Zellen (95 %) bei gleichzeitiger Anwesenheit der beiden Zytokine teilten.

IL 10 und BAFF zeigten sich ebenfalls synergistisch zur Kostimulation mit CD40L und erhöhten die Proliferationsraten in B-Zellen ebenfalls stark auf 88 % (CD40L+IL10) bzw. 72 % (CD40L+BAFF).

5.3 VERGLEICH DER EFFEKTSTÄRKE DER ZYTOKINE AUF ERHÖHUNG DER ZELLZAHL UND PROLIFERATION

Der Vergleich von Proliferationsindex und Lebend-Tot-Index gibt einen Hinweis über die Effektstärke der Zytokinwirkung auf Proliferation und die Anzahl an lebenden Zellen nach Kultivierungszeit.

In Abbildung 13 sind die erhobenen Indices vergleichend dargestellt. Auffällig sind hierbei die extrem hohen induzierten Proliferationsindices in CD40L+IL21 stimulierten Bursalymphozyten.

In B-Lymphozytenkulturen zeigen die Zytokine IL10, IL21 allein und in der Kombination keinen Einfluss, weder auf die Induktion von Proliferation noch auf die Erhöhung der B-Lymphozytenzahl nach Kultivierung. Für BAFF zeigte sich einen geringer Effekt auf die Induktion von Proliferation sowie die Lymphozytenzahl nach Kultivierung.

Der Proliferation induzierende Effekt in Anwesenheit von CD40L+IL21 zeigt durch die hohen PIs das Potential der synergistisch wirkenden Zytokine Proliferation in Bursalymphozyten zu induzieren. Der LT-Index bleibt auf einem niedrigeren Niveau.

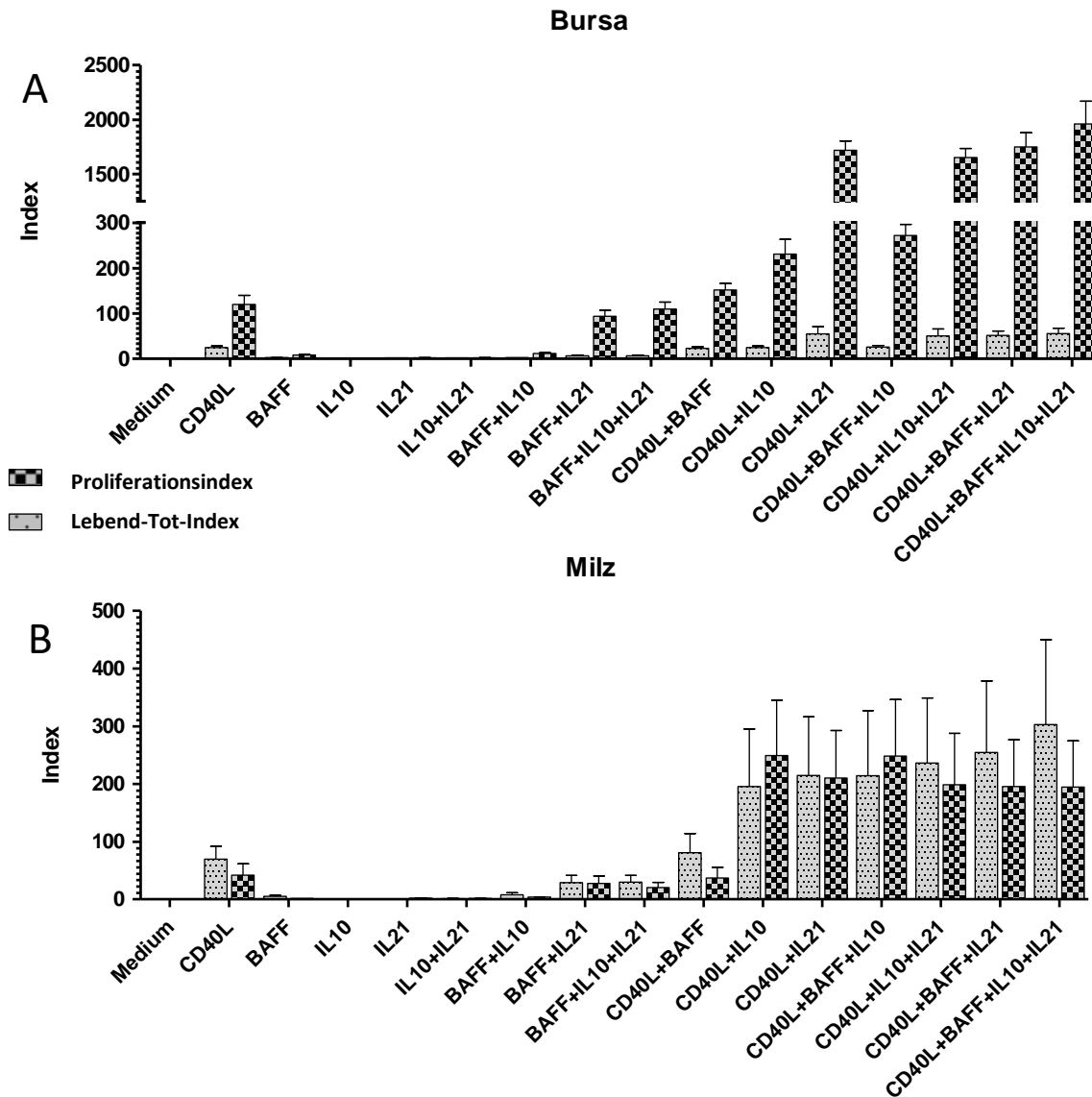


Abbildung 13: Proliferationsindex und Lebend-Tot-Index in Bursa- und Milzzellkulturen

Zum Vergleich der Effektstärke der Zytokinwirkung auf Überleben und Proliferation wurden PI und LT-Index berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerter +STABW von drei Tieren im Alter von 8-10 Wochen.

Betrachtet man den PI vergleichend zum LT-Index in Milzzellkulturen (siehe Abbildung 13 B) fällt im Unterschied zur Bursa auf, dass die Proliferationsindizes deutlich niedriger sind und in einigen Stimulationen vom Lebend-Tot-Index übertroffen werden.

Der LT-Index übersteigt für CD40L den PI um 28. Bei Zugabe von BAFF erhöht sich der Einfluss auf die lebende B-Zellzahl weiter und der LT-Index überragt den PI um 44 Indexpunkte. Durch weitere Zugabe kann der LT-Index weiter erhöht werden (CD40L+BAFF+IL21 um 59, CD40L+BAFF+IL10+IL21 um 108).

In Milzlymphozytenkulturen wird durch die Induktion der Proliferation auch eine erhöhte Zellzahl nach Kultivierung erreicht. Starke Proliferation induzierende Zytokine in Milzzellkulturen sind vor allem IL10 und IL21 in Kostimulation mit CD40L. BAFF in

Anwesenheit von CD40L erhöht die lebende Zellzahl nach Kultivierung und wirkt sich auch auf Erhöhung des LT-Index aus.

5.4 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG STIMULIERTER B-ZELLKULTUREN

Zur näheren Charakterisierung des Phänotyps der mit Kombinationen der Zytokine CD40L, BAFF, IL10 und IL21 stimulierten Lymphozytenkulturen aus Bursa und Milz wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch untersucht.

Es wurden die B-Zellmarker Bu1, BAFF-Rezeptor (BAFF-R) und die L-Kette des B-Zellrezeptors (L-Kette) ausgewählt.

Zusätzlich wurden das zur Kostimulation von B-Zellen wichtige Oberflächenprotein CD40 aus der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren, sowie die beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 und CXCR5 angefärbt.

Als Aktivierungsmarker wurde die Expression des MHC-Klasse-II-Moleküls (MHCII) und CD80, ein Typ-I-Membranprotein der Immunglobulin-Superfamilie, untersucht.

Da es sich bei den aus der Milz gewonnenen Lymphozyten um eine heterogene Population aus B- und T-Lymphozyten und zu einem geringeren Teil auch aus Makrophagen und anderen Zellen des hämatopoetischen Systems handelt, wurden Mehrfachfärbungen durchgeführt (siehe 4.6.3+4.6.6) und zunächst auf die lebende Bu1 positive B-Zellpopulation gated. So konnte die Markerexpression exklusiv auf der B-Zellpopulation analysiert werden. Danach wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der lebenden Bu1 positiven Zellen (Lebend-Tot Färbung siehe Abbildung 14 B+F) für die verwendeten Antikörper bestimmt. Diese Gatingstrategie wird in Abbildung 14 erläutert und wurde sofern das Gating nicht gesondert beschrieben wird, auch für nachfolgende Versuche angewendet.

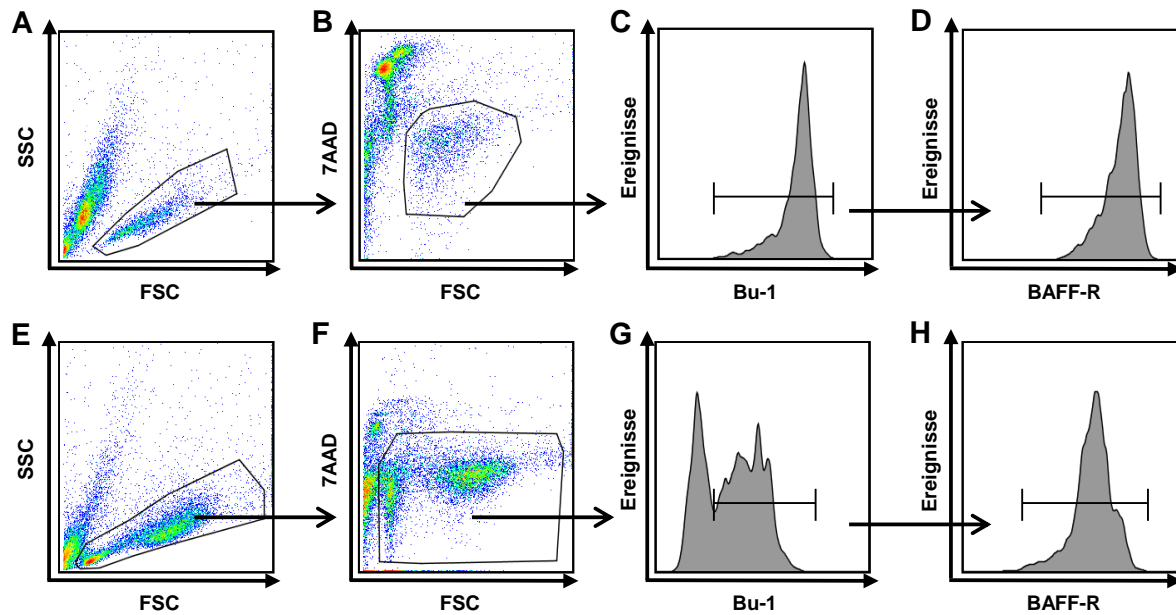


Abbildung 14: Gatingstrategie der phänotypischen Charakterisierung stimulierter B-Zellen

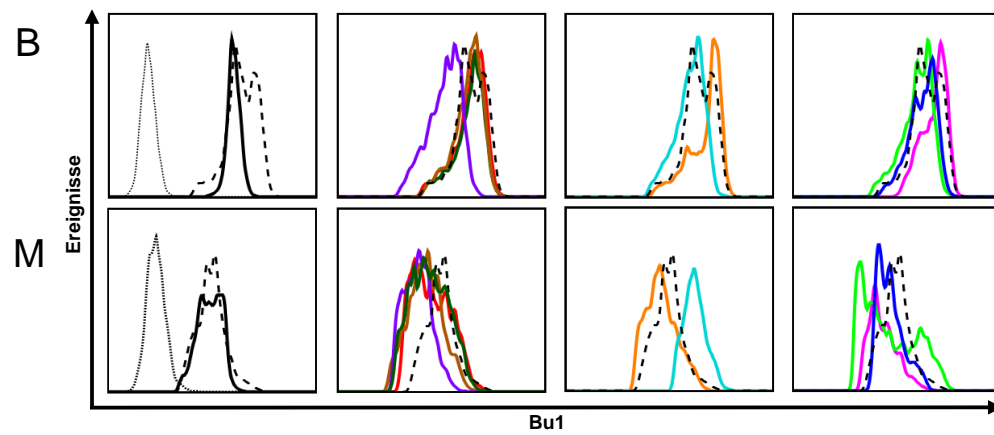
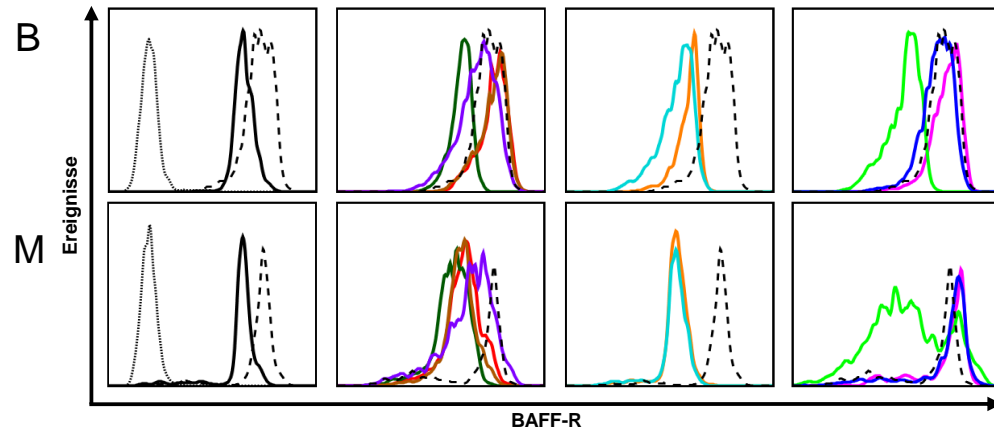
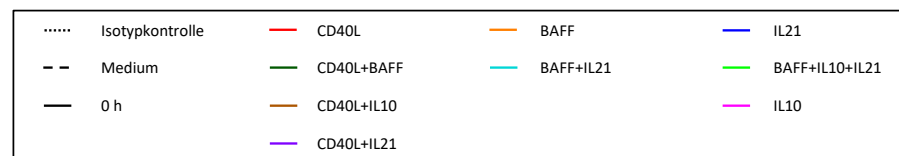
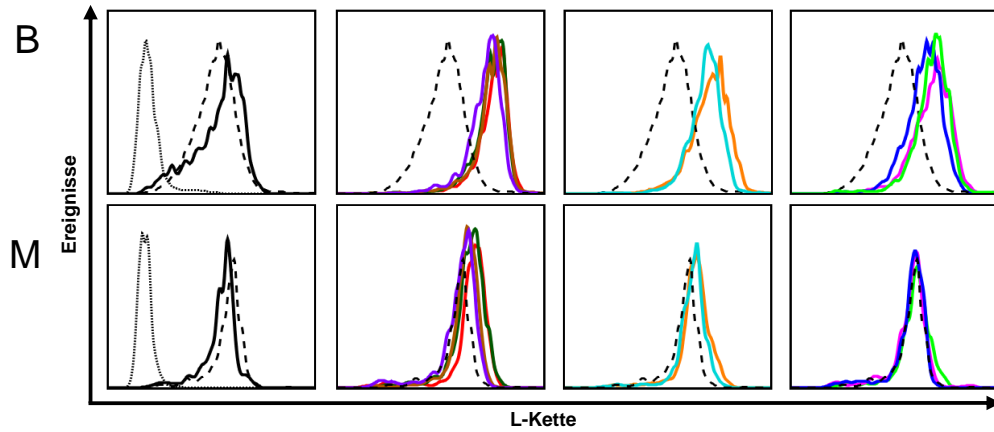
Bursa-(A-D) und Milz (E-H) -Leukozyten wurden nach oben dargestellter Strategie gated. Die Gates wurden anhand der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper gesetzt. Beispielfhaft gezeigt ist die durchflusszytometrische Untersuchung für den Marker BAFF-R eines Tieres für Bursa (nach 24 h) und Milz (nach 48 h).

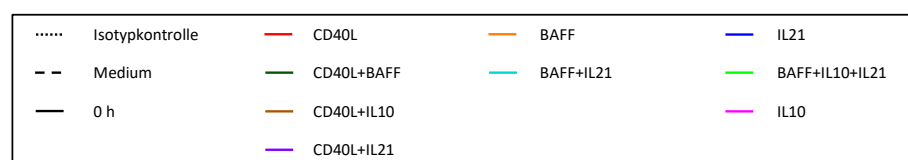
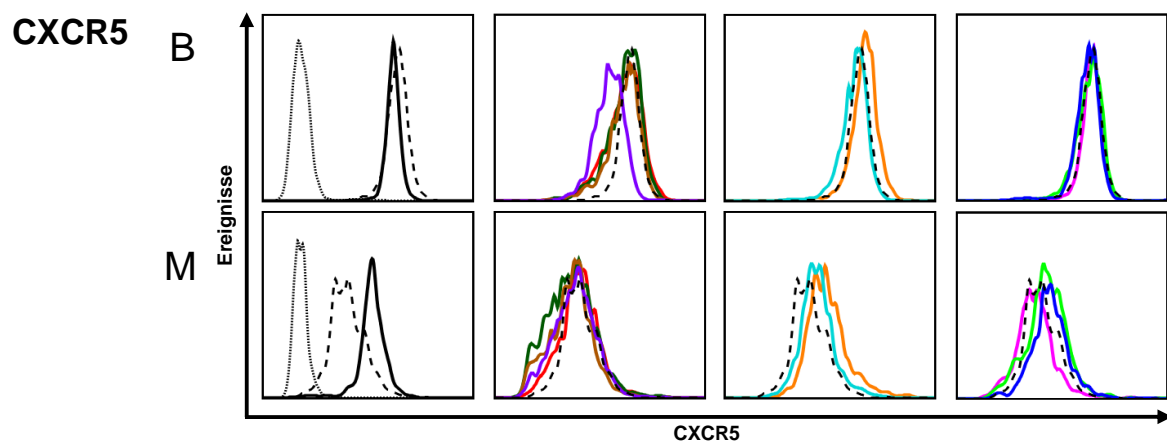
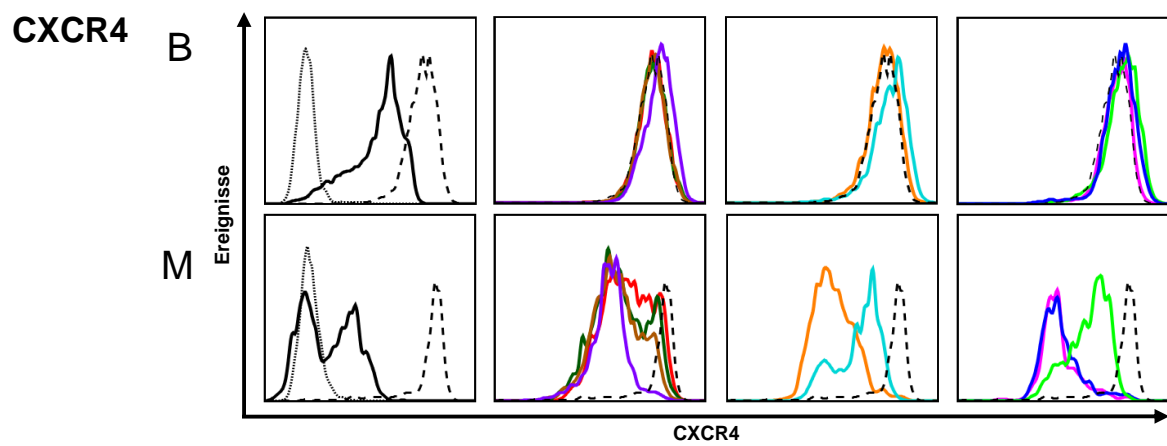
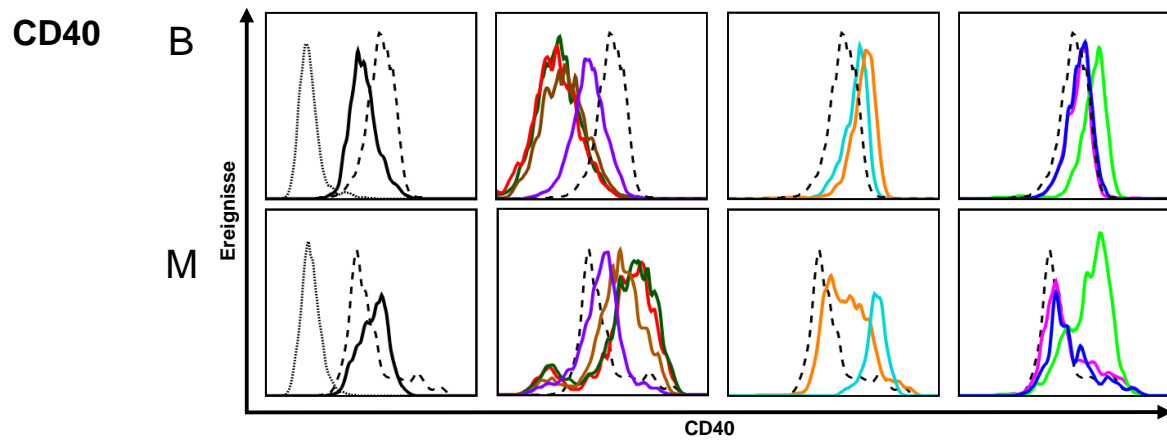
5.4.1 Expression von Oberflächenmarkern auf Hühner-B-Zellen

Über die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), welche ein Maß für die Menge des gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Zelle darstellt, wurde die Höhe der Markereexpression quantifiziert.

Die Abbildung 15 zeigt eine beispielhafte durchflusszytometrische Untersuchung für jeden untersuchten Oberflächenmarker. Die dazugehörigen MFIs wurden in Tabelle 15 als Heat Map visualisiert, indem eine im Vergleich zum Ausgangswert bei Isolation der Zellen niedrige bis hohe Fluoreszenzintensität einer Farbskala von rot über orange, gelb nach grün bis dunkelgrün zugeordnet wurde.

Interessanterweise führte die Kultivierung von Bursazellen in Medium ohne Zytokinzusätze zu einer Erhöhung der Expression fast aller ausgewählter Oberflächenmarker, außer der L-Ketten Expression; besonders stark ausgeprägt war dieser Effekt bei der BAFF-Rezeptor (B:2,5-fach), CXCR4 (B:4-fach) und CD80 (B:8-fach) Expression. In Medium kultivierten Milzzellen zeigte sich eine Zunahme der BAFF-R (1,5-fach) und CXCR4 (60-fach) Expression, während die Werte für L-Kette, CXCR5, MHCII und CD80 weitgehend konstant blieben.

Bu1**BAFF-R****L-Kette**



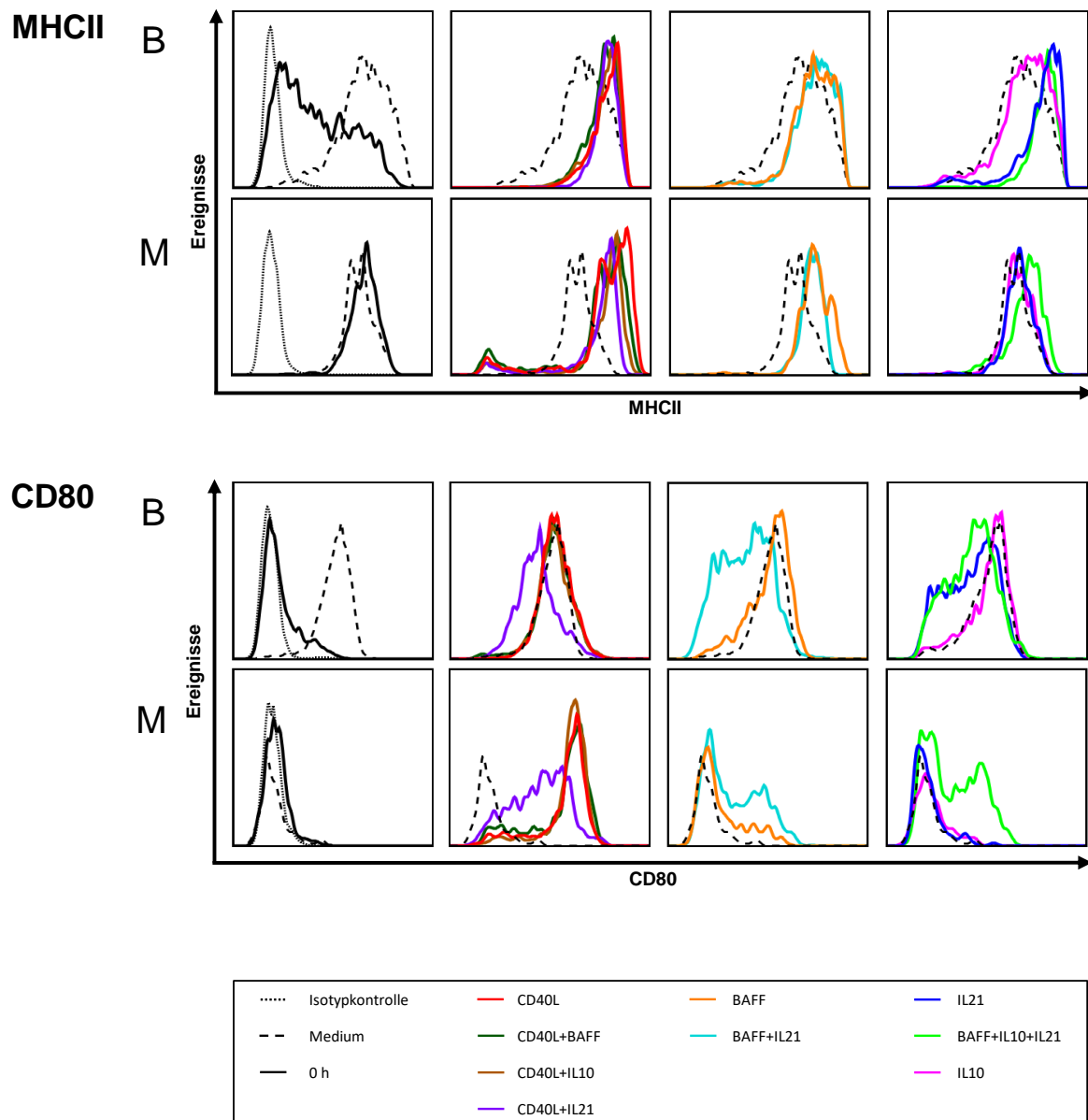


Abbildung 15: Durchflusszytomtrische Phänotypisierung der stimulierten Bursa- und Milzleukozyten

Mit Zytokinkombinationen aus CD40L, BAFF; IL10 und IL21 stimulierte Bursa- und Milzzellkulturen wurden nach Präparation zum Zeitpunkt (0 h), nach 24 h (B=Bursa) und nach 48 h (M=Milz) gegen die angegebenen Oberflächenmarker gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet ist eine exemplarische Untersuchung von mehreren unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die Markerexpression auf lebenden $Bu1^+$ Zellen, die Isotypkontrolle für den jeweiligen Antikörper ist im ersten Fenster exemplarisch auf CD40L stimulierten Zellen als schwarze gepunktete Linie dargestellt.

Bursa	0 h	Medium	CD40L	BAFF	IL10	IL21	BAFF+IL21	BAFF+IL10 +IL21	CD40L+BAFF	CD40L+IL10	CD40L+IL21
Bu-1	6.284	9.255	9.119	12.414	10.855	7.790	8.729	6.661	9.657	9.161	3.370
BAFF-R	8.510	20.548	22.923	4.537	22.957	15.893	3.754	2.679	4.270	21.786	12.898
L-Kette	3.697	6.723	19.690	13.317	10.396	7.877	11.647	10.036	16.958	16.896	12.555
CD40	1.607	3.429	485	5.624	3.787	4.163	7.076	7.235	500	593	1.384
CXCR4	5.708	20.994	23.946	16.245	23.351	25.783	24.041	23.151	16.759	22.858	25.730
CXCR5	5.100	6.015	6.035	8.721	6.465	5.875	6.396	5.303	5.735	5.358	2.504
MHCII	4.397	10.800	30.755	17.891	15.791	26.762	26.001	27.899	25.916	27.952	24.479
CD80	280	2.396	3.456	3.097	2.549	1.487	2.201	1.417	3.510	3.661	1.821
Milz 0h											
Bu-1	1.962	1.812	1.994	2.937	1.507	1.030	2.494	2.727	1.665	1.316	974
BAFF-R	9.440	14.274	7.569	4.129	16.036	13.436	5.579	4.870	2.984	5.651	5.891
L-Kette	8.089	4.849	8.820	6.372	5.021	2.755	6.397	7.188	9.671	9.402	6.558
CD40	2.327	2.970	5.457	3.830	3.295	2.772	4.817	5.371	5.847	4.622	2.438
CXCR4	533	33.776	17.174	23.491	16.101	18.470	15.370	11.928	14.477	9.714	10.396
CXCR5	4.060	2.730	2.031	3.871	5.799	1.843	4.745	4.697	1.775	1.660	4.519
MHCII	11.112	9.906	40.387	18.875	5.784	6.161	15.568	15.788	35.504	33.497	24.675
CD80	147	165	4.825	450	222	295	676	796	4.799	6.072	2.500

Tabelle 15: Heat Map Darstellung der Oberflächenexpression der gefärbten Marker auf stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Oberflächenfärbungen der Marker Bu1, BAFF-R, L-Kette, CD40, CXCR4, CXCR5, MHCII und CD80 auf lebenden Bu1⁺ Zellen aus stimulierten Bursa- und Milzzellkulturen nach 24 h (Bursa) bzw 48 h (Milz) im Vergleich zur Expression zum Zeitpunkt 0 h und zur Expression in Medium ohne Zytokinzusätze kultivierter B-Lymphozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente mit Hühnern im Alter von 8-10 Wochen. Die Heat Map wird von links nach rechts pro Marker gelesen, dabei geben die Abstufungen der Farbskalierung von dunkelrot (niedrig) über orange, gelb (mittel) nach hellgrün bis grün (hoch) die Markerexpression wieder. Zur besseren Lesbarkeit wurden Tausendertrennpunkte verwendet.

5.4.1.1 Bu1

Vor Kultivierung exprimierten alle B-Zellen der Bursa ein mittleres Niveau des etablierten Hühner B-Zellmarkers auf ihrer Oberfläche, durch Zytokinstimulation zeigte sich ein mittleres bis hohes Expressionsniveau von Bu1; das höchste Expressionsniveau des Markers fand sich in BAFF stimulierten B-Zellen. Eine Ausnahme zeigte sich mit CD40L+IL21; in diesem Stimulationsansatz wurde die Expression des Bu1 Markers gegenüber dem Niveau zum Zeitpunkt 0 h erniedrigt. Abgesehen von dieser Ausnahme wurde in bursalen B-Zellen ein relativ einheitliches Expressionsniveau induziert, in der Stimulation mit BAFF wurde ein mittleres und ein hohes Expressionsniveau induziert.

Auf B-Zellen in der Milz dagegen wurde Bu1 stärker reguliert. Auch in CD40L+IL21 stimulierten B-Lymphozyten aus der Milz sank die Expression von Bu1 stark (um die Hälfte), auch durch die Einzel-Stimulation mit IL21. Alle Stimulationen mit CD40L führten zur Herabregulation von Bu1 gegenüber dem 0 h Wert und der Kultivierung in Medium allein. Für Milz B-Zellen zeigten sich erhöhte Expressionslevels in BAFF stimulierten Kulturen, mit der höchsten Expression in der Stimulation mit BAFF+IL21. Unter Anwesenheit von BAFF+IL10+IL21 entstand eine größere Bu1 Population mit im Vergleich zum Medium erniedrigter MFI und eine kleinere Subpopulation mit erhöhter MFI.

5.4.1.2 BAFF-R

Neben einer erhöhten BAFF-R Expression in Medium allein, führte auch die Kultivierung mit IL10 und IL21 als Einzelstimulation auf B-Zellen aus Bursa und Milz zu vermehrter BAFF-R Expression.

CD40L induzierte unterschiedliche Expressionsniveaus in beiden Organen. Auf Bursalymphozyten bewirkte CD40L eine Erhöhung der BAFF-R Expression um das 2,5-fache im Vergleich zum 0 h Wert, wohingegen das Expressionslevel auf Milzlymphozyten durch die Stimulation mit CD40L um die Hälfte erniedrigt wurde.

Auffällig war, dass in allen BAFF-haltigen Bursa- und Milzkulturen im Vergleich zu Stimulationen ohne BAFF eine erniedrigte MFI des BAFF-R gemessen wurde.

Auch dieser B-Zellmarker wies für BAFF+IL21+IL10 stimulierte Milzlymphozyten Subpopulationen mit unterschiedlicher mittlerer Fluoreszenzintensität auf. Es entstand eine größere BAFF-R^{med} Population mit mittlerer MFI und eine kleinere BAFF-R^{high} Subpopulation mit erhöhter Expression des BAFF-R.

5.4.1.3 Leichte-Kette

Der B-Zellrezeptor wurde in Bursalymphozytenkulturen von einem niedrigen Expressionsniveau zum Zeitpunkt 0 h in allen Stimulationen unterschiedlich stark hochreguliert.

Die Kultivierung in Medium allein führte in Bursalymphozyten zu einem mittleren erhöhten Expressionsniveau des BCRs, in der Milz hingegen zu einer Abnahme der MFI um die Hälfte. Eine 5,3-fache Steigerung des Expressionsniveaus wurde bei Anwesenheit von CD40L detektiert, durch Zugabe additiver Zytokine CD40L+BAFF und CD40L+IL10 war die Steigerung(4,5-fach) gegenüber CD40L allein verringert.

Im Gegensatz dazu zeigten B-Zellen der Milz zum Zeitpunkt 0 h ein deutlich höheres Expressionsniveau, welches bei Anwesenheit von CD40L, CD40L+BAFF, CD40L+IL10 noch geringgradig erhöht wurde. Die Kultivierung in Anwesenheit von IL21 führte zu einer starken Verminderung der MFI um das 4-fache des Ausgangswerts und zur Induktion einer größeren L-Kette^{med} und einer kleineren L-Kette^{negativ} Population. Auch die Kombination von BAFF+IL10+IL21 induzierten zwei Populationen.

5.4.1.4 CD40

Die Zytokine CD40L, BAFF, IL10 und IL21 zeigten auf das Expressionsniveau des CD40 Rezeptors großen Einfluss. So wurde vor Kultivierung der Bursa- und Milzlymphozyten ein niedriges bis mittleres Expressionsniveau des CD40 Moleküls detektiert. Besonders auffällig war die starke Erniedrigung der MFIs von CD40 in CD40L-haltigen Stimulationen in Bursazellkulturen. Die Ausnahme war die Stimulation CD40L+IL21 hier wurde das Expressionsniveau auf einem ähnlichen Level der Expression zum Zeitpunkt vor Kultivierung gehalten. In Milzlymphozytenkulturen dagegen entstand in CD40L-haltigen Stimulationsansätzen CD40^{high} -, CD40^{med} -, und CD40^{negativ} - Phänotypen die sich durch ihre MFI in Subpopulationen abgrenzen ließen. Die MFI in Tabelle 15 muss hier als durchschnittliche MFI der entstandenen Subpopulationen betrachtet werden.

Die Kultivierung in Medium ohne Zytokinzusätze führte zu einer 2-fachen Erhöhung des Expressionslevels auf Bursalymphozyten, in Milzlymphozytenkulturen entstanden auch in Medium allein zwei Populationen von CD40^{high} und CD40^{med}.

Sowohl BAFF+IL21 als auch BAFF+IL21+IL10 führte in Bursa-und Milzlymphozyten zu einer Verdopplung der MFI für CD40.

IL21 induzierte in stimulierten Milzlymphozyten eine Subpopulation mit CD40^{high} und CD40^{med} sodass die MFI dem Ausgangswert vor Kultivierung entsprach.

In Bursalymphozyten kam es nicht zur Induktion von Subpopulation mit verschiedenen Abstufungen der Expressionshöhe.

5.4.1.5 CXCR4

Vor Kultivierung exprimierten bursale Lymphozyten den Chemokinrezeptor CXCR4 stärker (CXCR4^{med} und CXCR4^{high} Populationen) als Lymphozyten, die aus der Milz (CXCR4^{negativ} und CXCR4^{low}) isoliert wurden. Deshalb war der gemessene relative maximale Expressionsanstieg in Milzlymphozyten deutlich höher als für Bursalymphozyten.

Besonders stark wurde dieser Marker in beiden Organkulturen durch die Kultivierung in Medium ohne Zytokinzusätze hochreguliert (Milz: 60-fach, Bursa 4-fach).

Die höchsten MFIs auf Bursalymphozyten zeigte sich in Anwesenheit von CD40L und IL21 in Kombination und einzeln, allerdings wurden für alle Stimulationen ähnliche Werte wie bei Kultivierung in Medium allein detektiert.

Auffällig für Milzlymphozyten war einerseits der starke Expressionsanstieg bei in Medium kultivierten Lymphozyten gegenüber dem Zeitpunkt 0 h (bis 63-fach) und andererseits die reduzierte Expression von CXCR4 durch alle Stimulationen im Vergleich zur Mediumkultivierung, besonders stark durch BAFF+IL21+IL10. Durch die Anwesenheit von CD40L oder BAFF und additiven Zytokinen, mit Ausnahme der Stimulation CD40L+IL21, entstanden Subpopulationen mit unterschiedlicher CXCR4 Expression von CXCR4^{med} bis CXCR4^{high}.

5.4.1.6 CXCR5

Der Chemokinrezeptor CXCR5 wurde auf Bursa-und Milzlymphozyten vor Kultivierung auf einem mittleren Niveau exprimiert. In kultivierten Bursalymphozyten induzierte die Stimulation mit CD40L+IL21 eine Halbierung der MFI. Auffällig in allen mit CD40L (außer CD40L+IL21) kultivierten Milzlymphozyten zeigte sich neben einer Halbierung der MFI eine CXCR5 kleine negative Population neben einer Population mit anhaltender CXCR5 Expression. Die Stimulation mit CD40L+IL21 induzierte auf B-Zellen der Milz ein zum 0 h Wert vergleichbares Niveau und eine kleine CXCR5 negative Population.

5.4.1.7 MHCII

Bursalymphozyten zeigten vor Kultivierung eine heterogene Expression (MHCII^{low} und MHCII^{med}) des Aktivierungsmarkers MHCII. Nach 24 h in Kultur war der Marker außer auf einer Zellpopulation mit einem MHCII^{med} Phänotyp, auf den meisten Zellen verstärkt 6-fach exprimiert, auch ohne Zytokinzusätze. Maximale Expressionsniveaus wurden durch die Anwesenheit von CD40L und in der Stimulation mit BAFF+IL10+IL21 hervorgerufen.

Der in Milzlymphozytenkulturen auffällige Effekt war, dass neben der starken Erhöhung des Expressionsniveaus einer entstandenen MHCII^{high} Population eine kleine MHCII^{neg} Population in allen Stimulationen mit CD40L entstanden ist.

Die Kultivierung in Medium ohne Zytokinzusätze erzeugte in Milzlymphozyten ein mittleres Expressionsniveau des Aktivierungsmarkers vergleichbar mit dem Expressionsniveau vor Inkulturnahme der Zellen.

5.4.1.8 CD80

Die Analyse des kostimulatorischen Moleküls CD80 machte deutlich, dass nicht alle B-Zellen gleichermaßen durch die Zugabe der Zytokine aktiviert wurden, sondern in einigen Stimulationen Subpopulationen durch Zytokinzugabe zur Aktivierung angeregt wurden.

Vor Kultivierung der Lymphozyten wurde CD80 auf Milzlymphozyten nicht exprimiert und war auf 10 % der Bursalymphozyten nachweisbar.

In Medium ohne Zytokinzusätze kultivierte Milzlymphozyten bleiben CD80^{negativ}, das Expressionsniveau auf allen Bursalymphozyten stieg 8-fach an.

Die Anwesenheit von CD40L führte zu einer Aktivierung der Lymphozyten und äußerte sich in einem Anstieg der MFI von CD80. In Bursazellkulturen resultierte die Anwesenheit von IL21 in der Induktion von zwei Populationen unterschiedlicher MFI. Alle Kombinationen mit CD40L (außer CD40L+IL21) führten zu einem einheitlichen CD80^{high} Phänotyp unter Stimulationseinfluss, allerdings steigerte sich die MFI nicht im Vergleich zur Kontrollkultivierung in Medium. BAFF+IL21, sowie BAFF+IL10+IL21 induzierten eine Population negativer und mittlerer MFI. In Milzlymphozytenkulturen dagegen bildet sich eine CD80 negative sowie eine CD80^{veryhigh} B-Zellpopulation.

Die Ausnahme unter den CD40L Kombinationen bildet CD40L+IL21. In beiden Organkulturen führt der Einfluss von CD40L+IL21 zu einem verminderten Expressionsniveau verglichen mit den maximalen Expressionsniveaus der anderen

Zytokinkombinationen mit CD40L, aber dennoch zu einer Zunahme gegenüber dem Ausgangsniveau zum Zeitpunkt 0 h und zur Kultivierung in Medium ohne Zytokineinflüsse.

Unter Anwesenheit von BAFF und IL21 erhöht sich das Expressionsniveau in Bursazellkulturen 7- und in Milzzellkulturen 5-fach gegenüber der CD80 Expression vor Kultivierung. Dabei entstanden in beiden Organkulturen CD80^{med} und CD80^{negativ} Populationen, was dafürspricht, dass nicht alle Lymphozyten sondern Subpopulationen aktiviert werden.

Auch die Kombination von BAFF+IL10+IL21 induzierte in beiden Organen eine CD80^{med} und eine CD80^{negativ} Population.

Die Zytokine IL21 und IL10 einzeln hinzugefügt, führten nur in Bursalymphozyten zu Erhöhung der MFI der B-Zellen, wobei IL21 zwei Populationen ähnlich der Kombination mit BAFF+IL10 induziert, IL10 allein aber zu einer einheitlichen Erhöhung der MFI aller B-Zellen führt.

5.4.2 Am Rezeptor haftende Liganden

In den durchflusszytometrischen Untersuchungen zur Phänotypisierung mit den Oberflächenmarkern fiel auf, dass in allen CD40L- und BAFF-haltigen Stimulationen die gemessene MFI des dazugehörigen gefärbten Rezeptors vermindert war. Deshalb wurde nachfolgend untersucht, ob der zugegebene Ligand eventuell dauerhaft an seinen Rezeptor bindet und damit eine Färbung mittels Antikörper blockiert wurde. Hierzu wurde eine Färbung gegen CD40L und BAFF durchgeführt. CD40L konnte über sein Maus- CD8- α -Tag und BAFF über das im Protein enthaltene Flag-Epitop durchflusszytometrisch mit den Antikörpern anti-mouse-CD8 (anti-CD40L) und M2-Flag (anti-Flag) detektiert werden.

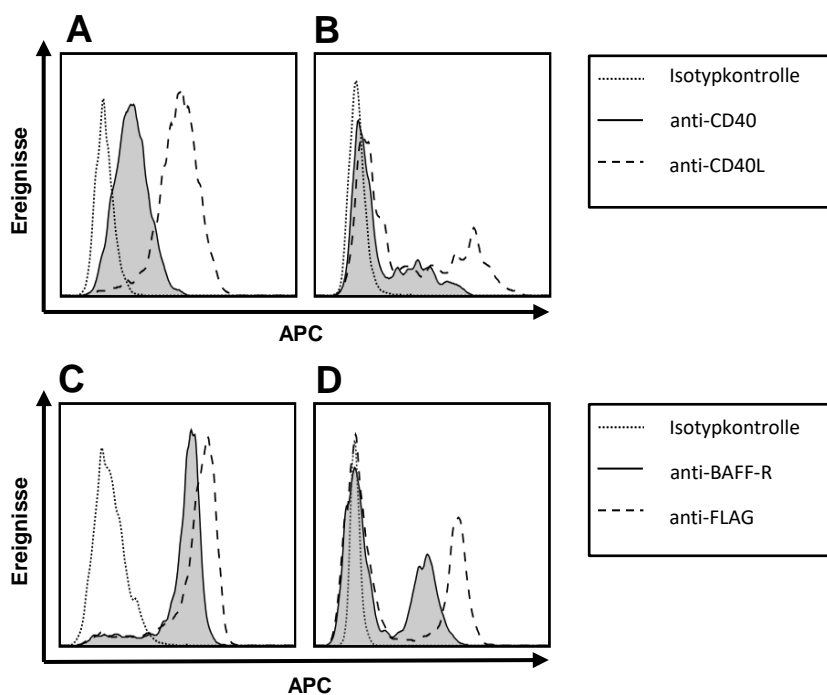


Abbildung 16: Oberflächenfärbung von CD40L und BAFF und zugehörigen Rezeptoren auf Lymphozyten
Nach Kultivierung von Bursa- (A+C) und Milzlymphozyten (B+D) in CD40L (A+B)- bzw. BAFF-haltigem (C+D) Medium, wurden Einfachfärbungen mit den Antikörpern anti-mouse-CD8 zum Nachweis des löslichen CD40L und anti-Flag (M2) zum Nachweis des löslichen BAFF auf der Zelloberfläche durchgeführt. Auch die Rezeptoren der Liganden, CD40 und BAFF-R wurden gefärbt. Dabei wurde auf die gesamte lebende Zellpopulation gated. Die Abbildung zeigt eine beispielhafte durchflusszytometrische Untersuchung mehrerer unabhängiger Experimente.

Wie Abbildung 16 belegt, sind die zur Stimulation eingesetzten Zytokine CD40L und BAFF an der Oberfläche der Zellen nach Ablauf der Kultivierungszeit durchflusszytometrisch nachweisbar. Die Liganden führen dabei nicht zu einer vollständigen Blockierung der Rezeptor-Färbung, denn die Lymphozyten sind gleichzeitig positiv für die Rezeptoren der Liganden CD40L und BAFF-R. Allerdings muss die in 5.4.1.4 auffällige Verminderung der MFI von CD40 und BAFF-R in Liganden-haltigem Medium kritisch interpretiert werden und kann nicht als verminderte Expression des Rezeptors angesprochen werden.

6 DISKUSSION

Da ein Großteil der B-Zellentwicklung beim Huhn in einem spezialisierten B-Zellreifungsorgan, der Bursa Fabricii, stattfindet, können Erkenntnisse, welche im Mausmodell oder in der Forschung mit humanen B-Zellen gewonnen werden nur bedingt auf das Huhn übertragen werden. Die molekularen Mechanismen zur Generierung des Antigen-Erkennungs-Repertoires des B-Zellrezeptors beim Huhn wurden dabei recht gut erforscht. Das Verständnis welche Signale dagegen diese Prozesse steuern ist bisher rudimentär. Deshalb ist es notwendig die Forschung am Hühner-Immunsystem zu intensivieren und das Verständnis der B-Zellentwicklung im Haushuhn zu verbessern. Dabei erschweren zwei Probleme die Erforschung des aviären B-Zellsystems. Zum einen die hohe Sterblichkeit primärer B-Lymphozyten *in vitro* und zum anderen fehlende Marker für die Abgrenzung verschiedener Entwicklungs- und Differenzierungsstadien der B-Zellen. Die beiden Möglichkeiten primäre B-Zellen des Huhns aus Bursa und Milz *in vitro* zu kultivieren ist bisher die Zugabe von CD40L oder BAFF zu Hühner-Leukozyten-Medium. Ohne diese artifiziell zugeführte T-Zellhilfe durch rekombinanten CD40L, welche dem zweiten Signal in der B-Zellaktivierung entspricht, kommt es zu einer massiv einsetzenden Apoptose der Lymphozyten *in vitro* [170]. Diese kann durch Zugabe von CD40L nicht gänzlich verhindert werden, jedoch ist es möglich geworden, Lymphozyten über einen längeren Zeitraum zu kultivieren.

Für die Erforschung von Wirt-Pathogen-Interaktionen von wirtschaftlich bedeutenden Erkrankungen welche die Geflügelgesundheit bedrohen, sind funktionierende primäre Leukozyten-Kultursysteme essentiell. Nach dem Prinzip der drei ‚R‘ -Replace, Reduce, Refine (vermeiden, verringern, verbessern) zurückgehend auf William Russel und Rex Burch [171] gilt es die Anzahl der verwendeten Tiere im Tierversuch zu reduzieren, was heute auch in § 7 Abschnitt 1b des deutschen Tierschutzgesetzes verankert ist. Mithilfe verbesserter *in vitro* Kultursysteme für B-Zell-tropische Erreger, wie beispielsweise das Virus der Marek'schen Krankheit oder der infektiösen Bursitis, könnten in Zukunft Hühner für den Tierversuch eingespart werden. Damit durch die Kultursysteme einheitliche Daten generiert werden können, muss bekannt sein, wie sich die *in vitro* Kultivierung auf die Lymphozyten auswirkt. Es ist wichtig zu wissen in welche Richtung sie sich differenzieren und welche Oberflächenmoleküle exprimiert werden, damit in einem speziellen Versuchsaufbau generierte Daten eindeutig einer Pathogen-assoziierten oder einer unter Kulturbedingungen physiologischen Veränderung zugeordnet werden können.

In Vorarbeiten war es gelungen Hühner-B-Zellen aus der Milz *in vitro* durch Stimulation mit CD40L über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und zu einem Plasmablast ähnlichen Phänotyp zu treiben [101, 102]. Daraufhin sollten in dieser Arbeit weitere potentiell zur Kostimulation mit CD40L synergistisch wirkende Zytokine auf immature B-Zellen aus der Bursa sowie mature B-Zellen aus der Milz des Haushuhns hinsichtlich Proliferation, Verbleib lebender Zellen nach Kultivierung und der Oberflächenexpression bestimmter Marker analysiert werden.

6.1 EINFLUSS VON CD40L, BAFF, IL10 UND IL21 AUF DIE LYMPHOZYTENZAHL NACH KULTIVIERUNGSZEIT

Zunächst wurden die lebenden B-Zellen nach Kultivierung in den verschiedenen Stimulationsansätzen bestimmt.

In beiden Organkulturen kam es im Vergleich zur eingesetzten Lymphozytenzahl zu einer starken Abnahme überlebender Lymphozyten. Allerdings konnte gegenüber in Medium kultivierten Lymphozyten die Zahl lebender B-Zellen durch Zugabe von Zytokinen gesteigert werden. Dabei wirkte sich die Zugabe von CD40L und CD40L-Kombinationen am stärksten auf die Steigerung der Lymphozytenzahlen aus. Die Einzel-Stimulation mit IL10 oder IL21 machte deutlich, dass für einen positiven Effekt auf die Erhöhung der Zellzahl die Kostimulation mit CD40L notwendig ist. Die Zugabe von CD40L+IL21 in Bursazellkulturen dieser Arbeit erzielte die maximal mögliche Steigerung der lebenden B-Zellen, wohingegen in Milzzellkulturen dieser Effekt sowohl durch CD40L+IL10 als auch CD40L+IL21 erreicht wurde. Die weitere Zugabe von BAFF zu den genannten Stimulationen bewirkte keinen Unterschied in Bursazellkulturen. Die Zahl lebender Milzlymphozyten war durch Zugabe aller Zytokine geringgradig über das hohe durch CD40L+IL10 oder CD40L+IL21 induzierte Zellzahlniveau steigerbar, was jedoch nicht statistisch signifikant war. Dennoch könnte dies darauf hindeuten, dass mature B-Zellen der Milz sensitiver sind für die Zytokinwirkung hinsichtlich der Steigerung der Zellzahl. BAFF allein scheint aber in Bursalymphozyten eine größere Rolle zu spielen, weil es die B-Zellrate bursaler Lymphozyten stärker steigert als die B-Zellrate in Milzlymphozyten. Diese Beobachtungen ähneln Studienergebnissen mit porcinen B-Zellkulturen, in welcher die Zugabe von CD40L, BAFF; IL21 und APRIL die Anzahl lebender B-Gedächtniszellen *in vitro* steigern konnte [154].

Überraschenderweise zeigte sich in Kulturen dieser Arbeit BAFF mit IL21 synergistisch und erhöhte sowohl lebende Bursa- als auch Milzlymphozyten nach Kultivierung, wobei der Effekt in Milzlymphozyten stärker ausgeprägt war. Dies könnte darauf hindeuten, dass BAFF

in der Lage ist, das Signal durch CD40L zu ersetzen und B-Zellen zu aktivieren. Ob es sich dabei um eine Subpopulation handelt, welche durch die Kombination von BAFF+IL21 besonders ansprechbar ist, so wie es für eine Subpopulation humaner B-Zellen aus der Milz nachgewiesen wurde, kann aufgrund fehlender Marker derzeit nicht untersucht werden [115, 118]. Die Ergebnisse geben Hinweise auf einen deutlichen Gewebeunterschied zwischen Bursa und Milz. Die massiv einsetzende Apoptose in Bursalymphozyten, welche durch eine große Anzahl toter Zellen in jeder durchflusszytometrischen Untersuchung auffällt, spiegelt das Schicksal bursaler Lymphozyten physiologischerweise *in vivo* wieder. 95 % der B-Zellen in der Bursa gehen durch Apoptose zu Grunde und nur 5 % verlassen die Bursa in Richtung Peripherie [64]. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass auch *in vitro* die massive Apoptose nicht verhindert werden kann. Im Säuger ist IL21 auch in der Lage Apoptose zu induzieren. [164]. Ob IL21 auch auf Hühner B-Zellen einen Apoptose induzierenden Effekt ausübt, sollte durch weitere Versuche und Langzeitkultivierung mit Quantifizierung der Apoptoserate weiterführend untersucht werden

6.2 PROLIFERATION

Der Erhöhung der Zahl lebender Zellen durch Zytokineinwirkung können zwei Ursachen zu Grunde liegen: Entweder die ursprünglich eingesetzten Lymphozyten haben vermehrt überlebt oder ein Teil von ihnen hat sich durch Zellteilung vermehrt. Die Zytokin-induzierte Proliferation wurde mit zwei verschiedenen Proliferationsassays untersucht. Zunächst wurden Daten zur Zytokin-induzierten Proliferation im [³H]-Thymidin-Assay für stimulierte Bursa- und Milzlymphozyten generiert und nachfolgend die proliferierende Lymphozyten-Population in Milzlymphozytenkulturen mithilfe des Proliferationsfarbstoffes *eFluor670* und zusätzlicher B- und T-Zellfärbung durchflusszytometrisch identifiziert.

Mit Verwendung von *eFluor670* ist es gelungen, eine umweltfreundlichere und bezüglich der Arbeitssicherheit einfachere Alternative zum Proliferationsassays mit radioaktiv markiertem [³H]-Thymidin zu etablieren. Ebenso bietet der Proliferationsassay mit *eFluor670* eine gute Alternative zur aufwändigen Trennung von Zellpopulationen durch Zellsorting. Analog dem Protokoll des häufig verwendeten Zellteilungsmarkers *Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester* (CFSE) eingesetzt, eignet sich *eFluor670* nach den Erfahrungen in dieser Arbeit auch bei Hühnerlymphozyten gut, um sich teilende Subpopulationen durch zusätzliche Antikörperfärbung anzusprechen und zu identifizieren. Dabei wurde die Vitalität und Teilungsfähigkeit der Lymphozyten nicht auffällig beeinflusst. Allerdings muss die

Auswirkung auf Lymphozyten bei Langzeitkultivierungen mit weiteren Versuchen überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte das zur Verfügung stehende, auf Hühner-B-Zellen einwirkende Zytokin-Repertoire mit dem durch Novak et al. im Jahr 2000, zuerst im Überstand humaner aktivierter CD3⁺-Zellen beschriebene IL21 erweitert werden [144]. Durch seine Erforschung in den darauf folgenden Jahren, wurde IL21 als das potenteste, auf die B-Zellbiologie der Säuger Einfluss nehmende, Zytokin identifiziert. Es hat pleiotrope Wirkung auf die Differenzierung und Proliferation von T- und B-Zellen [118, 153]. Den Grundstein zur Erforschung der Wirkung von IL21 auf das Hühner Immunsystem legten Rothwell et al. mit der Identifizierung der Gensequenz von IL21 im Hühnergenom und der Herstellung des rekombinanten, biologisch aktiven Moleküls. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde das Potential von IL21 im Huhn im Hinblick auf die T-Zell Kostimulation und die Inhibierung der Reifung von Dendritischen Zellen untersucht [166].

Daten zur Wirkung von IL21 auf Hühner-B-Zellen fehlen, deshalb sollte in dieser Arbeit IL21 hinsichtlich seiner Wirkung auf die Proliferation von B-Zellen aus Bursa und Milz *in vitro* untersucht werden, zusätzlich zur Kostimulation mit CD40L, BAFF und IL10 mit teilweiser bereits bekannter Funktion auf das Hühner-B-Zellsystem. Laborinterne Vorarbeiten konnten den synergistischen Effekt von CD40L und IL10 auf die Proliferation der Hühner B-Zellen *in vitro* bestätigen [102], wie er auch für Säuger-B-Zellen bekannt war [140]. Die [³H]-Thymidin-Assay Daten dieser Arbeit zeigen eine massive Proliferation in Bursa- und Milzlymphozyten durch die Stimulation mit CD40L+IL21. Ergänzende Proliferationsassays mit *eFluor670* und durchflusszytometrische Färbungen von Milzlymphozyten ergaben, dass sich bei Anwesenheit von CD40L+IL21 auch in in Milzzellkulturen hauptsächlich B-Zellen teilen. Damit konnte diese Arbeit nachweisen, dass IL21 auch im Huhn potent auf die Induktion von Proliferation in Hühner B-Zellen wirkt. In Bursalymphozyten brachte die weitere Zugabe der Zytokine IL10 und BAFF zur Stimulation mit CD40L+IL21 im [³H]-Thymidin-Assay keine Änderung der Proliferation. In Bursalymphozytenkulturen scheint CD40L+IL21 für die Induktion der maximalen Proliferation ausreichend zu sein, wohingegen in Milzlymphozytenkulturen auch durch CD40L+IL10 maximale Proliferationsraten erzielt werden können. Dabei muss erwähnt werden, dass in Vorversuchen zu dieser Arbeit mit Hühnern unterschiedlichen Alters, die durch CD40L+IL10 induzierten Proliferationsraten immer sehr hoch waren, aber nie die Wirkung von CD40L+IL21 erreichten. Denkbar wäre, dass mature Milzlymphozyten altersabhängig mit unterschiedlicher Ansprechbarkeit gegenüber IL10 reagieren. Für immature B-Zellen aus der Bursa scheint das Signal

CD40L+IL10 nicht auszureichen für eine maximale Stimulation. Aus Untersuchungen im Säuger ist bekannt, dass das Differenzierungsstadium einer B-Zelle zum Zeitpunkt der Zytokinstimulation durch IL10 von Bedeutung ist [172].

Die hier erhobenen Daten sprechen dafür, dass es sich bei den festgestellten Zytokinwirkungen in dieser Arbeit um synergistische Effekte handelt und nicht um die Addition der Zytokinwirkungen, dies zeigte die Kultivierung der Lymphozyten mit den jeweils einzelnen Zytokinen. Die gemessene Proliferationsrate der durch CD40L aktivierten B-Zellen und zugegebener Zytokine überstieg die addierten Proliferationsraten zur mittleren Proliferationsrate durch CD40L alleine vielfach. Diese Beobachtung stimmt mit Untersuchungen von Säuger-B-Zellen überein, welche zeigten, dass die Stimulation mit CD40L die Ansprechbarkeit von humanen [138] sowie porcinen [154] B-Zellen gegenüber der Stimulation mit zusätzlichen Zytokinen verbessert. In Proliferationsassays dieser Arbeit war BAFF in der Lage geringgradige Proliferationsraten im [³H]-Thymidin -Assay zu induzieren, dabei war der Effekt auf mature B-Zellen der Milz stärker ausgeprägt. Mithilfe *eFfluor670* markierter Milzlymphozyten konnten gezeigt werden, dass unter BAFF-Stimulation 20 % der B-Zellen zur Teilung angeregt wurden. Allerdings war der Einfluss von BAFF auf die Erhöhung der lebenden B-Zellrate in der Bursa stärker ausgeprägt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stärken die Resultate vorheriger laborinterner Arbeiten, dass BAFF auch auf Hühner-B-Zellen wichtige Überlebenssignale ausübt. Studien mit retroviraler Expression von humanem BCMA, welches die BAFF-Wirkung in Hühnern *in vivo* neutralisierte, führten zu einer drastischen langanhaltenden Reduktion der B-Zellzahlen in behandelten Hühnern [123]. Dabei wurde BAFF als wichtiges Zytokin in der primären bursalen B-Zellentwicklung beim Huhn charakterisiert. Im Gegensatz dazu sind frühe B-Zellen im Knochenmark bei Mensch und Maus noch nicht BAFF abhängig [106]. Der Effekt auf periphere Hühner-B-Zellen scheint dem Mechanismus im Säuger zu ähneln und eine konservierte Bedeutung für BAFF bei beiden Spezies zu belegen.

Auch die Proliferation betreffend zeigten sich BAFF+IL21 synergistisch durch erhöhte Proliferationsraten in Bursa- und Milzlymphozyten, was nahelegt, dass die erhöhten B-Zellraten nach BAFF+IL21-Stimulation durch Zellteilung entstanden sind. Der Effekt war in der Milz stärker ausgeprägt als in der Bursa, was darauf hinweist, dass mature Milzlymphozyten auf die alleinige Stimulation durch BAFF+IL21 besser ansprechbar sind, als die immaturen B-Zellen aus der Bursa, welche für eine adäquate Aktivierung weitere bzw. andere Signale benötigen. Diese Ergebnisse sind weitere Hinweise dafür, dass BAFF auch im Huhn in der Lage ist die Wirkung von CD40L bezüglich der Kostimulation mit IL21 zu

ersetzen, da sowohl in immaturen wie auch in maturen B-Zellen Proliferation durch BAFF+IL21 induzierbar ist. Für eine sehr kleine Subpopulation humaner B-Zellen wurde die schnelle Differenzierung von B-Gedächtniszelle zur Plasmazelle durch Stimulation mit BAFF+IL21 nachgewiesen [118]. Die Fähigkeit von BAFF als Ersatz für das CD40L Signal zu dienen, wird in dieser Studie damit begründet, dass BAFF und CD40L gemeinsame Signale des NF κ B-Signalings nutzen [116, 117]. Ob es sich auch bei auf BAFF+IL21 reagierenden Hühner-Lymphozyten um eine abgrenzbare Subpopulation von B-Zellen handelt, die einen gesonderten Phänotyp aufweist, kann aufgrund fehlender Marker derzeit nicht endgültig untersucht werden. Die phänotypischen Färbungen dieser Arbeit geben aber Hinweise auf einen aktivierten B-Zell-Phänotyp mit einer hohen CD40, MHCII und CD80 Expression der unter BAFF+IL21 proliferierenden Population. Ob in Bursalymphozytenkulturen eine oder mehrere Teilpopulationen von B-Zellen zur Proliferation angeregt werden, muss in einem zum mit *eFluor670* markierten Milzlymphozyten analogen Versuchsansatz noch geklärt werden.

6.3 ZYTOKIN-INDUZIERTER PHÄNOTYPÄNDERUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige für das Huhn vorhandene Antikörper verwendet, um Hinweise auf Zytokin induzierte B-Zellaktivierung zu bekommen. Der entstehende Phänotyp unter Zytokineinfluss wurde anhand dieser Antikörper durchflusszytometrisch charakterisiert.

6.3.1 Expression von B-Zellmarkern stimulierter B-Lymphozyten

Um die Expression von Oberflächenmarkern gezielt auf Hühner B-Zellen zu analysieren, wurde der etablierte Hühner B-Zellmarker Bu1 (Klon AV20), welcher sowohl gegen die Antigene Bula als auch Bu1b gerichtet ist, verwendet [173]. Der Marker wird auf allen Differenzierungsstadien der B-Zellen im Huhn exprimiert, außer auf Plasmazellen, diese verlieren ihn, je weiter die Differenzierung fortgeschritten ist [174]. In den angewendeten Stimulationen war auffällig, dass Bu1 in Milzlymphozytenkulturen stärker reguliert war als in gleichen Ansätzen stimulierter Bursalymphozyten. So zeigen alle Stimulationen mit CD40L in dieser Arbeit eine Herabregulation des Bu1-Markers auf Milzlymphozyten, was auf ein eingeleitetes Differenzierungsprogramm Richtung Plasmazelle hindeutet, wie es auch in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde [101]. Dass auch die Stimulation mit BAFF+IL21 die Induktion einer Population mit geringerer Bu1 Expression, neben einer fortbestehenden Bu1 exprimierenden Population bewirkt, gibt Hinweise darauf, dass BAFF hier in der Lage war das Signal durch CD40L zu ersetzen und ebenfalls ein Differenzierungsprogramm

Richtung Plasmazelle eingeleitet wurde; oder aber BAFF+IL21 war in der Lage in einem Teil der B-Zellen die Bu1-Expression aufrechtzuerhalten.

Für nachfolgende Arbeiten könnte sich der BAFF-R als Marker für Hühner B-Zellen als besser geeignet zeigen, da dieser durch die CD40L Stimulationen weniger reguliert zu sein scheint. Die durchgängige BAFF-R Expression auf stimulierten Bursa- und Milzlymphozyten stützt die These, dass B-Zellen wichtige überlebenssichernde Signale via BAFF-R erhalten [122]. Auffällig war in allen Stimulationen mit BAFF eine reduzierte MFI der BAFF-Rezeptor-Färbungen gegenüber den Stimulationen ohne BAFF. Durchflusszytometrisch war das Flag-Epitop-markierte BAFF auf der Oberfläche der B-Zellen nach Kultivierung in BAFF-haltigem Medium nachweisbar, deshalb kann die verminderte MFI nicht als Herabregulation des Rezeptors betrachtet werden. Wahrscheinlicher ist, dass alle Zytokin-stimulierten B-Zellen in den Kulturen BAFF-R auf der Oberfläche exprimieren, um die überlebens-erhaltende Signale durch BAFF-R Signaltransduktion empfangen zu können. In Milzzellkulturen war eine kleine BAFF-R-negative Population sichtbar.

Die L-Kette des B-Zellrezeptors war in allen stimulierten B-Zellen aus der Bursa deutlich über ein durch Medium allein induziertes Niveau exprimiert. In Milzlymphozyten konnte durch Zytokinstimulation kein höheres L-Kettenniveau als durch die Mediumkultivierung erzielt werden. Diese Tatsache festigt die Annahme, dass Bursalymphozyten als immature Lymphozyten zusätzliche Signale zur vollständigen Aktivierung benötigen. Für mature Milzlymphozyten scheinen die Medium befindlichen Signale für den Erhalt des BCR auf der Zelloberfläche auszureichen. Allerdings zeigte sich in Milzlymphozyten zusätzlich eine kleine Population L-Kette-negativer Lymphozyten. Hierbei könnte es sich um Zellen handeln, welche kurz vor dem Zelluntergang stehen, denn nur B-Zellen mit hoher B-Zellrezeptor-Expression überleben. Einsetzende Apoptose geht in der Bursa mit dem Verlust der BCR-Expression einher [65]. In den stimulierten Kulturen fiel in den durchflusszytometrischen Analysen eine Vielzahl toter Zellen auf, welche allerdings nicht quantifiziert wurden. Eine enddifferenzierte Plasmazelle zeichnet sich durch den Verlust der oberflächlichen B-Zellrezeptor-Färbung aus, zugunsten der Zunahme der intrazellulären Antikörper-Produktion. Somit ist die durchweg hohe L-Kette Expression ein Hinweis darauf, dass in den stimulierten Lymphozytenkulturen dieser Arbeit keine enddifferenzierten Plasmazellen entstehen. Ob in der L-Kette negativen Subpopulation zu einem geringen Teil Plasmablasten entstehen, oder ob es sich um Zellen handelt welche kurz vor dem

Zelluntergang ihre Marker verlieren, kann beispielsweise mit intrazytoplasmatischen Immunglobulinfärbungen weiter abgeklärt werden.

6.3.2 CD40

CD40 wird beim Huhn neben Monozyten, Makrophagen und T-Zellsubpopulationen auf allen Bu1- positiven Zellen des B-Zellsystems exprimiert [175]. Kothlow et al. zeigten, dass durch CD40L stimulierte proliferierende Milzlymphozyten teilweise Bu1 herunterregulieren, vermehrt CD40 exprimieren und sich zu einem Plasmablast-ähnlichen Phänotyp vergrößern. Der andere Teil der B-Zellen, welche nicht durch die imitierte T-Zellhilfe aktiviert wurden bleibt klein und exprimiert CD40 vermindert [101].

In Kulturen dieser Arbeit fiel zunächst die verminderte Expression von CD40 in allen CD40L-haltigen Stimulationen auf. Durch Färbungen gegen das Maus-CD8 α -Tag des rekombinanten CD40L konnte der Verbleib des zugegebenen CD40L auf der Oberfläche der B-Zellen nach Kultivierung festgestellt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Gardell et al. konnte die Akkumulierung von löslichem fluoreszenzmarkierten CD40L auf murinen B-Zellen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in dieser Studie gezeigt, dass der durch T-Zellen abgegebener CD40L durch Endocytose in B-Zellen aufgenommen wird. Die Forschergruppe stellt dabei die Hypothese auf, dass dieser Mechanismus dazu beitragen könnte, dass es seltenen B-Zellen mit höherer Antigenaffinität gelingt, gegen andere B-Zellen bei limitierter CD40L-T-Zellhilfe konkurrenzfähig zu bleiben [91]. Somit ist die Beobachtung dieser Arbeit nicht ungewöhnlich, dass CD40L auf der B-Zelloberfläche haftet; allerdings muss die untersuchte Färbung für den CD40-Rezeptor vorsichtig interpretiert werden und kann nicht mit einer echten Herunterregulation des Rezeptors gleichgesetzt werden. In weiterführenden Doppelfärbungen gegen CD40 und CD40L könnte quantifiziert werden, wieviel CD40 durch den am Rezeptor haftenden CD40L blockiert wurde, vergleichend zu Simulationsansätzen ohne CD40L.

Genauer betrachtet zeigten sich in den Färbungen der stimulierten Bursakulturen eine stark verminderte MFI der CD40-Färbung in allen mit CD40L stimulierten Bursalymphozyten gegenüber dem Mediumansatz oder ohne CD40L kultivierten Stimationsansätzen. Nur CD40L+IL21 war in der Lage eine höhere CD40 Expression gegenüber den anderen Stimulationen mit CD40L zu induzieren. Als mögliche Ursache wäre hier denkbar, dass Bursalymphozyten unter Einfluss von CD40L+IL21 so stark proliferieren (höchste Proliferationsrate im [³H] Thymidin-Assay), dass in diesem Ansatz der zugegebene CD40L nicht ausreichte, um die CD40-Färbungen abzuschwächen.

Das Färbebild in CD40L-stimulierten Milzlymphozytenkulturen konnte die im ersten Absatz beschriebenen früheren Ergebnisse bestätigen. Obwohl auch auf Milzlymphozyten nach Kultivierungszeit CD40L auf der B-Zelloberfläche nachweisbar war, konnte trotzdem eine erhöhte CD40-Expression gegenüber dem Ausgangswert festgestellt werden, was für eine deutliche Aktivierung der stimulierten Milzlymphozyten spricht. Zusätzlich zeigte sich in CD40L-haltigen Stimulationen eine deutlich abgrenzbare CD40-negative B-Zellpopulation, die den Rezeptor wahrscheinlich herunterreguliert. Allerdings sollten zum endgültigen Nachweis ebenfalls die die Doppelfärbungen gegen CD40 und CD40L durchgeführt werden.

Die Stimulation mit BAFF+IL21 resultierte auf Bursa und Milzlymphozyten mit einer vermehrten CD40-Expression, ein Hinweis, dass es auch durch BAFF+IL21 zur Aktivierung der B-Zellen kommt und die vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle angeregt wurde; die Zugabe von IL10 machte keinen signifikanten Unterschied.

6.3.3 Aktivierungsmarker

Der Expression von MHCII kommt bei der Präsentation von Antigen eine essentielle Bedeutung zu. Nachdem Antigen zusammen mit dem B-Zellrezeptor internalisiert und prozessiert wurde, können Proteinbestandteile via MHCII einer zugehörigen T-Zelle dargeboten werden. Nachfolgend kommt es zwischen B- und T-Zelle zur Interaktion über CD40-CD40L und zur Induktion verschiedener Oberflächenmoleküle [98]. Durch gesteigerte MHCII-Expression wird die Antigen-präsentierende Fähigkeit einer B-Zelle verbessert und kann nachfolgend zur Aktivierung weiterer Immunzellen führen. Die CD40L-vermittelte Induktion vermehrter MHCII-Expression ist sowohl für Mensch und Maus als auch für die GALT-Spezies Schwein [176] und Huhn [101] nachgewiesen.

6.3.3.1 MHCII

In den Untersuchungen dieser Arbeit war auffällig, dass allein die Entnahme der Lymphozyten aus dem Gewebeverband und ihre Kultivierung in Medium die Expression von MHCII sowohl auf Bursa- als auch auf Milzlymphozyten verstärkte.

In Bursalymphozytenkulturen dieser Arbeit kam es zu einem weitestgehenden Verlust der MHCII_{low}-Population. Mike Ratcliffe postulierte anhand seiner Studien mit *in situ* FITC- (Fluorescein isothiocyanate) gelabelten Bursalymphozyten, dass nur die MHCII-positiven Lymphozyten die Bursa verlassen. Demnach ist die Annahme wahrscheinlicher, dass es in Kulturen dieser Arbeit zum Absterben der MHCII_{low} Population *in vitro* gekommen ist und nur bursale Lymphozyten eines MHCII^{high} Phänotyps überleben, als die Hypothese,

dass die ursprüngliche aus der Bursa isolierte MHCII_{low} Population durch Zytokin-Stimulation in der Lage war, MHCII hochzuregulieren.

In Milzlymphozytenkulturen war die Entstehung einer kleinen MHCII-negativen Population in allen Stimulationen mit CD40L auffällig. Neben der starken Erhöhung des MHCII Expressionsniveaus in der entstandenen MHCII^{high}-Population, ist eine kleine MHCII-negative Population sichtbar, hier könnte es sich um Zellen handeln, die vor dem Zelluntergang ihre Marker-Expression verlieren. Plasmazellen bei Säugetier-Spezies wie Mensch und Maus, zeichnen sich durch den Verlust der MHCII-Expression aus [32]. Bei der MHCII_{neg} Population in allen CD40L Stimulationen dieser Arbeit, könnte es sich um Richtung terminal differenzierte Plasmazellen handeln, welche sich durch den Verlust der MHCII Expression auszeichnen. Die Hinweise, dass sich einige Lymphozyten aus der Milz unter den gewählten Stimulationen zu einem Plasmazell-ähnlichen Phänotyp treiben lassen, spiegelt die physiologische Herkunft aus einem sekundären lymphatischen Organ wieder, welches auf Antigenkontakt und die Produktion von Plasmazellen in Germinalen Zentren spezialisiert ist. Da für das Huhn eindeutige Plasmazellmarker fehlen, könnten intrazytoplasmatische Immunglobulin-Färbungen Hinweise darauf geben, ob sich in den ausgewählten Stimulationsansätzen tatsächlich differenzierte Plasmazellen nachweisen lassen. Unreife Lymphozyten aus der Bursa dagegen benötigen wohl mehr Stimuli, zum Beispiel über den BCR, um sich terminal zu differenzieren und verharren in den angesetzten Kulturen in einem aktivierten Zustand.

6.3.3.2 CD80

Nach erfolgreich geleisteter T-Zellhilfe über CD40L kommt es durch Induktion kostimulatorischer Moleküle zur vermehrten CD80-Expression auf der B-Zelle. CD80 dient der Bindung an CD28 (mit schwacher Affinität) oder CTLA4 (mit höhere Affinität) auf der T-Zelle [177, 178]. Wie für die Säugetier-Spezies Mensch, Maus und Schwein steht als weiterer Aktivierungsmarker auch für Hühner B-Zellen ein Antikörper gegen CD80 zur Verfügung. Ob durch CD80-Ligation eine dem Säuger gleichwertige Aktivierung der B-Zelle erfolgt, muss allerdings noch abschließend geklärt werden. Bei Mensch und Maus wird das Antigen auf naiven und frühen Germinalen Zentrums-B-Zellen nur in sehr geringer Menge exprimiert, auf aktivierten B-Zellen, späten Zentrozyten und Gedächtnis-B-Zellen wird es dagegen vermehrt exprimiert. Plasmazellen verlieren mit fortschreitender Differenzierung die CD80-Expression wieder [33]. Porcine B-Gedächtniszellen zeigten sich CD80-positiv, *in*

vitro allerdings konnte die CD80-Expression nur durch Zugabe des Zytokins CD40L aufrechterhalten werden [154].

Eine vorausgegangene laborinterne Doktorarbeit beschrieb die CD80-Expression im Huhn auf einer Subpopulation naiver bursaler B-Zellen in geringer Menge, mature Milzlymphozyten dagegen als CD80-negativ. Langzeitkultivierungen von Hühner-B-Zellen aus der Milz mit CD40L brachten eine Population mit anhaltend hoher CD80-Expression und eine Population mit abfallender CD80 Expression hervor [102]. Die CD80-Expression nativer B-Zellen aus Bursa und Milz konnte mittels Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Weiterhin konnte diese Arbeit die Hochregulation von CD80 in CD40L-stimulierten B-Zellen aus Bursa und Milz bestätigen. Dabei kam es in Milzlymphozyten zur Induktion einer CD80-negativen Population und einer CD80-positive Population. Möglich wäre allerdings auch, dass nach einer gesamthaften Hochregulation eine Teilpopulation CD80 herunterregulierte; ist aber unwahrscheinlicher, da es sich in dieser Arbeit nicht um Langzeitkultivierungen handelt. Daher ist eher davon auszugehen, dass in Milzlymphozytenkulturen nicht die gesamte B-Zellpopulation aktiviert wurde, sondern Subpopulationen angeregt wurden und die CD80-Expression hochregulierten. Dafür spricht auch die Tatsache, dass in allen Stimulationen mit hohen B-Zell-Proliferationsraten (in allen Stimulationen mit CD40L annähernd 100%) die CD80-positive Population größer ist als in den Stimulationen, welche zu niedrigeren B-Zell-Proliferationsraten führten. BAFF+IL21 beispielsweise induzierte in 75% der B-Zellen Proliferation und zeigte eine kleinere CD80-positive Population. Um diese These zu stärken, sollten Versuche mit *eFlour670*-markierten Lymphozyten und anschließender CD80-Färbung durchgeführt werden.

Das Färbebild von stimulierten Bursalymphozyten spricht eher für eine einheitlichere Hochregulation von CD80. Interessanterweise führte die Kultivierung von Bursalymphozyten in Medium ohne Zytokinzusätze zu einer verstärkten Expression von CD80, während in Medium kultivierte Milzlymphozyten CD80-negativ blieben. Das wirft die Frage auf, was zur Aktivierung der in Kultur verbrachten Bursalymphozyten führt. Denkbar wäre, dass Bursalymphozyten einen Faktor ins Medium abgeben, welcher autokrin auf B-Zellen wirkt. Dies würde auch die verstärkte Expression weiterer in dieser Arbeit gefärbter Oberflächenmarker von in Medium kultivierten Bursalymphozyten erklären. Erste Hinweise ergibt die nahezu deckungsgleiche Histogrammkurve der CD80-Fluoreszenz von in BAFF bzw. Medium kultivierten B-Zellen aus der Bursa und den resultierenden ähnlichen mittleren Fluoreszenzintensitäten der durchflusszytometrischen Färbungen. Da bekannt ist, dass BAFF autokrin von B-Zellen produziert wird [119-121] wäre eine *ex vivo* anhaltende BAFF-

Produktion durch B-Zellen zur Überlebenssicherung durchaus denkbar. Ebenfalls wurde in der Literatur das Vorkommen von CD40L in der Bursa bestätigt [100]. Da es sich bei den ca. 2 % der in der Bursa vorkommenden T-Zellen um CD8⁺-T-Zellen handelt, ist eine Produktion des in der Bursa anwesenden CD40L durch Stromazellen wahrscheinlicher.

Anhand von Proteomanalysen könnte weiterführend untersucht werden, welche Proteine sich im Überstand kultivierter Bursa- und Milzlymphozyten nach Kultivierungszeit befinden und so weiteren Hinweis auf physiologische Unterschiede zwischen Bursa- und Milzlymphozyten aufdecken.

6.3.4 Chemokinrezeptoren

Die homöostatischen Chemokine CXCL12 und CXCL13 binden an ihre Rezeptoren CXCR4 bzw. CXCR5. Durch Regulation und Verteilung der Rezeptoren wird die Entwicklung lymphoider Strukturen sowie die Migration von Lymphozyten gesteuert.

6.3.4.1 CXCR4

Florian Busalt zeigte in seiner Doktorarbeit, dass CXCR4 auf allen Bursalymphozyten exprimiert wird. Eine Subpopulation der bursalen B-Zellen zeigte dabei einen CXCR4_{low}-Phänotyp. Auf B-Lymphozyten aus der Milz wird CXCR4 nur auf einer Subpopulation exprimiert. Durch Stimulation mit CD40L *in vitro* wurde CXCR4 verstärkt exprimiert [169].

In allen Stimulationsansätzen mit bursalen B-Zellen dieser Arbeit zeigte sich CXCR4 hochreguliert, wobei kein Unterschied zwischen der Stimulation mit oder ohne CD40L ermittelbar war. Die Kultivierung von Milzlymphozyten in Medium allein steigerte die Expression von CXCR4 stark, die Zugabe von Zytokinen erniedrigte dagegen die Expressionshöhe von CXCR4 wieder. In allen Stimulationen mit CD40L und auch in BAFF+IL21 entstand in Milzlymphozyten eine dem physiologischen Expressionsniveau vor Kultivierung ähnliche niedrigere CXCR4- Expression gegenüber der alleinigen Medium Stimulation, nicht jedoch durch Behandlung mit den einzelnen Zytokinen. Für die unspezifische verstärkte CXCR4-Expression nach Entnahme der Lymphozyten aus dem Gewebeverband müssen auch andere Mediatoren wie pH-Wertänderung des Mediums und durch Zellstress abgegebene Moleküle bedacht werden, durch welche die verstärkte Oberflächenexpression bewirkt wurde. Zum Beispiel wurde in murinen Stammzellen nachgewiesen, dass Hypoxie die Hochregulation von CXCR4 induziert und so die Stammzell-Migration beeinflusst wird [179]. Vorstellbar wäre, dass der kurzzeitige

hypoxische Zustand durch Präparation der Lymphozyten aus dem Gewebeverband ausreichte, um die Expression von CXCR4 aufrecht zu erhalten.

Im Säuger wurde gezeigt, dass in Richtung Plasmazelle differenzierte Lymphozyten durch eine anhaltend hohe Expression von CXCR4 charakterisiert sind, welche die Zellen befähigt, in andere Gewebe einzuwandern [180]. Das anhaltend hohe CXCR4-Niveau bursaler Lymphozyten passt zum übrigen Phänotyp der stimulierten Bursalymphozyten und könnte dafürsprechen, dass die B-Zellen durch CXCR4-Expression Kontakt mit Stromazellen herstellen, um im Gewebeverband festgehalten zu werden. Wobei die Signale durch Zytokinsimulation in Milzlymphozyten ausreichen, um die CXCR4-Expression zu senken; ein Hinweis darauf, dass die reiferen Lymphozyten aus der Milz in ihrer Differenzierung etwas weiter fortgeschritten sind.

6.3.4.2 CXCR5

CXCR5 ist ein bedeutender Chemokinrezeptor für die Ausbildung lymphatischer Strukturen und wichtig bei der Migration von Lymphozyten in B- und T-Zellareale von lymphatischen Organen. Hauptsächlich wird er auf CD45-positiven Lymphozyten exprimiert, aber auch auf einer Reihe anderer hämatopoetischer Zellen [181]. Durch Generierung des monoklonalen Antikörpers gegen Hühner CXCR5 konnte Florian Busalt in seiner Arbeit zeigen, dass alle B-Zellen des Huhns CXCR5 positiv sind [169].

In Bursalymphozytenkulturen dieser Arbeit zeigt die Zytokinstimulation fast keine Regulierung der CXCR5-Expression. Wie auch in Medium allein kultiviert, exprimieren alle Bursalymphozyten unter Zytokinstimulation ein dem Ausgangswert vor Kultivierung entsprechendes Niveau von CXCR5. Eine Ausnahme stellt die Stimulation mit CD40L+IL21 dar, hier wurde die Expression von CXCR5 halbiert. Alle mit CD40L-stimulierten B-Zellen der Milz zeigten eine kleine Population CXCR5 negative B-Zellen.

Für murine B-Zellen wurde gezeigt, dass die Anordnung von B-Zellen in helle und dunkle Zonen im Germinalen Zentrum über die Expression von CXCR4 und CXCR5 gesteuert wird. Durch Erkenntnisse dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass auch Hühner-B-Zellen die Expression von den für die Migration von B-Zellen wichtigen Chemokinrezeptoren *in vitro* aufrechterhalten. Weiterführende Untersuchungen zur Migrationsfähigkeit der unterschiedlich stimulierten Lymphozyten könnte mittels Chemotaxis-Assays durchgeführt werden. Plasmazellen im Säuger regulieren CXCR5 zugunsten einer hohen CXCR4-Expression herunter [182]. Ob es sich bei der kleinen CXCR5-negativen Milzlymphozytenpopulation um

in Richtung Plasmazelle differenzierte Lymphozyten handeln könnte, sollte mittels intrazytoplasmatischer Immunglobulinfärbungen weitergehend überprüft werden.

6.3.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass B-Zellen aus Bursa und Milz durch CD40L und synergistisch wirkende Zytokine sehr stark zur Proliferation angeregt werden können.

Es ist gelungen primäre B-Zellen aus dem Huhn nach Isolation in einem artifiziellen System zu kultivieren, obwohl entscheidende Signale, wie sie eine B-Zelle *in vivo* erfahren würde, fehlen. Eine B-Zelle im natürlichen Zellverband würde durch Antigenbindung mittels ihres B-Zellrezeptors das erste Aktivierungssignal erfahren [21]. Durch das isolierte Signal 2, wie es in den Kulturbedingungen dieser Arbeit über CD40L zustandekommt, würde bei Mensch und Maus als Schutz vor Autoimmunität der unverzügliche Zelltod durch Hochregulation von FAS-Ligand auf den B-Zellen eingeleitet werden [183, 184].

Die generierten Daten dieser Arbeit belegen eine bedeutende Wirkung von IL21 auf Hühner-B-Zellen aus Bursa und Milz. Dabei wurden weitere Erkenntnisse über Signale der B-Zelldifferenzierung beim Huhn gewonnen, dennoch sind viele Fragen der zugrunde liegenden Mechanismen zur Regulation der B-Zellentwicklung offengeblieben. Durch den Nachweis funktioneller mRNA durch Rothwell et al. ist anzunehmen, dass IL21 auch *in vivo* proliferative Wirkung auf Hühner B-Zellen aus Bursa und Milz hat [166]. Ein funktioneller Knockout *in vivo* durch beispielsweise die retrovirale Expression eines IL-21-Inhibitors könnte die regulatorische Funktion von IL21 auf die B-Zellentwicklung weiterführend charakterisieren. Die gleichzeitig verminderte MHCII-, CD80- und CXCR5-Expression einer kleinen Subpopulation von Kombinationen mit CD40L-stimulierten B-Zellen aus der Milz legt die Vermutung nahe, dass hier ein Differenzierungsprogramm Richtung Plasmazelle eingeleitet wurde. Weitergehend sollten diese Vermutungen durch Fakten belegt werden. Die Fähigkeit der entstandenen B-Zellen Antikörper zu produzieren und einen Ig-Klassenwechsel einzuleiten, könnte mithilfe der ELISPOT-Technologie bestimmt werden. Dabei sollte die Stimulationszeit werden verlängert werden und das Signal durch CD40L nach einer anfänglichen Aktivierung weggenommen werden, so dass die terminale Differenzierung der B-Zellen ermöglicht wird. Dabei wird interessant sein festzustellen, ob und unter welchen Zytokineinflüssen die B-Zellen einen Isotypklassenwechsel des sezernierten Immunglobulins vollziehen können. Vergleichende Untersuchungen auf Transkriptionsebene zwischen den Stimulationen mit CD40L+IL21 und BAFF+IL21 könnten Aufschluss über angeschaltene

Signaltransduktionswege geben.

Ob auch in der Bursa Teilpopulationen durch Zytokine zur Proliferation angeregt werden oder ob vielmehr alle B-Zellen der Bursa gleichermaßen angesprochen werden, kann durch Analysen mit *eFluor670*-markierten Bursalymphozyten parallel zu den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Milz getestet werden. Es wäre zudem wichtig zu wissen, ob es sich bei den durch Proliferation entstandenen B-Lymphozyten um lang- oder kurzlebige Zellen handelt. Dies könnte mittels quantitativer Zellzahlbestimmungen über mehrere Tage festgestellt werden. Ob die zugegebenen Zytokine auch das Überleben der entstandenen Zellen fördern könnte durch Färbungen mit Zellteilungsmarkern quantifiziert werden.

Diese Arbeit hat weiterführende Erkenntnisse über die Signale der B-Zelldifferenzierung beim Huhn zum Vorschein hervorgebracht. Dabei wurde deutlich, dass entsprechend ihrer Herkunft aus unterschiedlichen lymphatischen Organen Bursa- und Milzlymphozyten differenziert auf Zytokinstimuli *in vitro* reagieren.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, das aus der Säuger-B-Zellentwicklung bekannte, potente Zytokin IL21 in Kombination mit CD40L, BAFF und IL10 zur Stimulation von Hühner-B-Zellen aus Bursa und Milz einzusetzen und deren Effekte auf Proliferation, Überleben und phänotypische Änderungen in der Expression wichtiger Oberflächenmoleküle zu untersuchen.

Die Proliferation betreffend, hatten in beiden Organen weder IL10 noch IL21 alleine einen Effekt. Der Zusatz von BAFF führte zu einer geringfügigen, CD40L zu einer stärkeren Erhöhung der Proliferationsrate. Während IL10 und IL21 einen deutlichen Synergismus mit CD40L und eine extrem hohe ^3H -Thymidin-Aufnahme zeigten, bewirkte die Kombination CD40L+BAFF keine weitere Steigerung der Proliferation. Die maximale Proliferation wurde in der Bursa nur durch CD40L+IL21 erzielt. In Milzzellkulturen gelang dies dagegen sowohl durch CD40L+IL21 als auch durch CD40L+IL10.

Interessanterweise konnte ein, wenn im Vergleich zu CD40L auch schwächerer, Synergismus zwischen BAFF und IL21 in B-Zellen aus Bursa- und Milz nachgewiesen werden. Da BAFF und CD40L gemeinsame Teilschritte der NF κ B-Signalkaskade aktivieren, scheint BAFF hier als abgeschwächter Ersatz für das CD40-Signaling zu dienen. Mit Hilfe des Proliferationsfarbstoffes *eFluor670* wurde nachgewiesen, dass in gemischten Lymphozytenpopulationen der Milz durch die verwendeten Zytokine fast ausschließlich B-Zellen zur Proliferation angeregt wurden und sich in Ansätzen mit CD40L+IL10 und CD40L+IL21 annähernd 100 % der B-Zellen geteilt haben.

Die Anzahl lebender B-Zellen war in den Stimulationen mit hohen Proliferationsraten am größten. Aber auch BAFF war in der Lage, die Anzahl lebender B-Zellen zu steigern und zeigte dabei einen größeren Effekt auf die immaturen B-Zellen der Bursa. Durch Vergleich des Lebend-Tot-Index mit dem Proliferationsindex fiel auf, dass auf Bursalymphozyten die Zytokin-induzierte Proliferation bei weitem überwog. In Milzlymphozyten war dagegen der Lebend-Tot-Index für alle Stimulationen entweder gleich dem Proliferationsindex bzw. überstieg diesen für die Kombination aus CD40L+BAFF+IL21+IL10 sogar deutlich. Während die Zytokine folglich in den immaturen B-Zellen aus der Bursa massiv Proliferation induzieren, die Zellen aber auch sehr rasch absterben lassen, führen die gleichen Stimuli in den weiter differenzierten, maturen B-Zellen aus der Milz nicht nur zur Proliferation, sondern erhöhen auch ihre Überlebensrate.

Die durchflusszytometrischen Färbungen zeigten, dass durch die Stimulation mit den ausgewählten Zytokinkombinationen die Expression von B-Zell-Rezeptor, Zytokinrezeptoren (CD40, BAFF-R), Aktivierungsmarkern (CD80, MHCII) und Chemokinrezeptoren (CXCR4, CXCR5) stark verändert wurde, wobei sich auch hier deutliche Unterschiede zwischen kultivierten Bursa- und Milzlymphozyten zeigten.

Bei den B-Zellen aus der Bursa führte alleine die Kultivierung in Medium zu einer deutlichen Aktivierung und verstärkten Expression aller untersuchten Oberflächenproteine, besonders deutlich war dies für CXCR4. Dieser Effekt wurde auch durch die Zugabe von BAFF, IL10 oder IL21 kaum beeinflusst. Alle Stimulationen, die CD40L enthielten, führten jedoch zu einer weiteren Erhöhung der Expression von B-Zellrezeptor und MHCII, einem Phänotyp, der *in vivo* den aus der Bursa emigrierenden Zellen entspricht. Die Kombination CD40L+IL21 verminderte außerdem die Expression von CXCR5, was eine Voraussetzung für die Emigration darstellen könnte.

Die Phänotypisierung der stimulierten Milz-B-Zellen ergab dagegen ein deutlich heterogeneres Bild. So führte die Kultivierung in Medium alleine zu keiner erhöhten Expression von CD80 und MHCII, die Expression des B-Zellrezeptors wurde sogar halbiert. Wie in Bursazellen wurde aber auch hier eine extrem starke Induktion von CXCR4 beobachtet. BAFF, IL10 und IL21 alleine wiesen eine z.T. verstärkende, z.T. inhibierende Funktion auf die Expression der Marker auf. Die Kombinationen mit CD40L führten zu einer starken Induktion von CD80 und MHCII. Die Expression von Bu1, einem Hühner spezifischen B-Zellmarker, der im Verlauf der Differenzierung zur Plasmazelle langsam verloren geht, war vor allem in der Kombination aus CD40L+IL21 stark reduziert. Auffällig war in den Milzzellkulturen außerdem, dass durch mehrere Stimulationen für die Aktivierungsmarker, CD40, BAFF-R und den B-Zellrezeptor eine kleine Subpopulation mit sehr niedriger Expression entstand, deren Funktion noch geklärt werden muss.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, durch die Stimulation mit synergistisch wirkenden Zytokinen in Bursalymphozyten einen hoch proliferativen, aktivierten Zustand ähnlich der Situation *in vivo* im Follikelcortex zu induzieren. B-Zellen aus der Milz konnten ebenfalls stark zur Proliferation angeregt werden, wie es *in vivo* bei Bildung von Germinalen Zentren vorkäme, und zeigten phänotypisch eine weitergehende Differenzierung in Richtung von Plasmablasten mit der Entstehung von zusätzlichen Subpopulationen. So zeigt die vorliegende Arbeit, dass die gleichen Zytokin-Signale in der B-Zelldifferenzierung in Bursa und Milz unterschiedliche zelluläre Reaktionen induzieren.

8 SUMMARY

Aim of this study was to use IL21, a cytokine well known for its role in mammalian B-cell development, in combination with CD40L, BAFF and IL10 to stimulate chicken B-cells from the bursa of Fabricius and the spleen and analyse the cytokines' effects on proliferation, survival and expression of selected surface molecules.

Regarding proliferation, on B-lymphocytes from both organs neither IL10 nor IL21 showed an effect on their own. Adding of BAFF to the cultures, lead to a minor increase, the addition of CD40L to a considerable increase of cell proliferation. While IL10 and IL21 showed a very strong synergism with CD40L and resulted in an extremely high ^3H -thymidine uptake (>300.000 cpm), combining CD40L and BAFF did not further enhance cell proliferation. In bursal cell cultures the maximal proliferation rate was solely obtained with CD40L+IL21, in splenocytes this worked with both combinations CD40L+IL21 and CD40L+IL10.

Interestingly, for B-cells from both organs also a synergism between BAFF and IL21 was observed, though weaker than the effect of CD40L+IL21. As BAFF and CD40L share parts of the NF κ B signaling cascade, BAFF seems to function as a partial replacement for CD40L in this setting. Experiments with the proliferation dye *eFlour670* demonstrated that in mixed leucocyte cultures from the spleen by the selected cytokine combinations proliferation was almost exclusively induced in B-cells and in cultures with CD40L+IL21 and CD40L+IL10 not only a subpopulation but virtually 100% of B-cells proliferated.

Stimulations with a high proliferation rate also obtained the highest numbers of viable cells per culture. In addition, BAFF did increase the number of viable cells with a more pronounced effect on immature bursal then more mature splenic B-cells. Comparison of viability-index and proliferation-index revealed that in cultures from bursal B-cells cytokine induced proliferation clearly outweighed the pro-survival effect. In contrast, in cultures of splenic B-cells for most cytokine combinations the viability-index was quite similar to the proliferation-index and exceeded it even clearly for CD40L+IL10+IL21+BAFF. Thus the applied cytokine combinations induce strong proliferation in bursal cells, which is combined with rapid cell death, while the very same stimuli in cultures from further differentiated, mature B-cells from the spleen do induce proliferation and at the same time increase viability.

As shown by flow cytometry, stimulation with selected cytokines did strongly affect surface expression of B cell receptor (BCR), cytokine receptors (BAFF-R, CD40), activation markers (CD80, MHCII) and chemokine receptors (CXCR4, CXCR5), again revealing significant differences between cells from bursa and spleen.

Culture of the cell in medium only lead in bursal B-cells already to a strong activation and increased the expression of all analyzed surface proteins, which was most pronounced for CXCR4. Addition of BAFF, IL10 or IL21 did hardly induce additional changes. However, all stimulations containing CD40L further increased the expression of BCR and MHCII, a phenotype corresponding to cells, which *in vivo* emigrate from the bursa. In addition, CD40L+IL21 reduced CXCR5 expression, which could be a prerequisite for emigration.

Phenotyping of stimulated splenic B-cells resulted in a more heterogeneous picture. As in bursal cells cultivation in medium alone did strongly induce CXCR4, but did not increase the expression of CD80 and MHCII and BCR expression was even reduced by halve. BAFF; IL10 and IL21 alone showed partly an enhancing and partly an inhibiting effect on marker expression. However, their combination with CD40L consistently induced a strong upregulation of CD80 and MHCII. Interestingly, in spleen cell cultures several cytokine combinations induced a small subpopulation with very low expression of activation markers, CD40, BAFF-R and BCR, whose function has to be resolved.

In summary, this work demonstrated that stimulation with synergistically acting cytokines is able to induce a highly proliferative, activated state in bursal lymphocytes, which is similar to the situation in the follicle cortex *in vivo*. B-lymphocytes from the spleen were as well stimulated to strong proliferation, a state *in vivo* occurring in germinal centers. In addition, marker expression on those cells showed signs of further differentiation towards a plasmablast like phenotype with the formation of further subpopulations. Hence, in cultures mimicking chicken B-cell differentiation identical cytokine signals induces different cellular reactions in cells from bursa and spleen.

.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Davison, F., *Chapter 1 - The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 1-9.
2. Murphy, J.B., *THE EFFECT OF ADULT CHICKEN ORGAN GRAFTS ON THE CHICK EMBRYO*. J Exp Med, 1916. **24**(1): p. 1-5.
3. Glick, B., T.S. Chang, and R.G. Jaap, *The bursa of Fabricius and antibody production*. Poultry Science, 1956. **35**(1): p. 224-225.
4. Rottach, E.-M., *Generierung neuer Marker für Hühner B-Zellen*. 2012. I, S.6.
5. Nunez, C., et al., *B cells are generated throughout life in humans*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 866-72.
6. Akashi, K., et al., *Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 1-12.
7. Alt, F.W., T.K. Blackwell, and G.D. Yancopoulos, *Development of the primary antibody repertoire*. Science, 1987. **238**(4830): p. 1079-87.
8. Harman, B.C., et al., *T/B lineage choice occurs prior to intrathymic Notch signaling*. Blood, 2005. **106**(3): p. 886-92.
9. Bain, G., et al., *E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements*. Cell, 1994. **79**(5): p. 885-92.
10. Lin, H. and R. Grosschedl, *Failure of B-cell differentiation in mice lacking the transcription factor EBF*. Nature, 1995. **376**(6537): p. 263-7.
11. Brack, C., et al., *A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination*. Cell, 1978. **15**(1): p. 1-14.
12. Ehlich, A., et al., *Immunoglobulin heavy and light chain genes rearrange independently at early stages of B cell development*. Cell, 1993. **72**(5): p. 695-704.
13. Melchers, F., et al., *The surrogate light chain in B-cell development*. Immunol Today, 1993. **14**(2): p. 60-8.
14. Ehlich, A., et al., *Analysis of the B-cell progenitor compartment at the level of single cells*. Curr Biol, 1994. **4**(7): p. 573-83.
15. Hardy, R.R., et al., *Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow*. J Exp Med, 1991. **173**(5): p. 1213-25.

16. Tiegs, S.L., D.M. Russell, and D. Nemazee, *Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells*. J Exp Med, 1993. **177**(4): p. 1009-20.
17. Nossal, G.J., *B-cell selection and tolerance*. Curr Opin Immunol, 1991. **3**(2): p. 193-8.
18. Chung, J.B., M. Silverman, and J.G. Monroe, *Transitional B cells: step by step towards immune competence*. Trends Immunol, 2003. **24**(6): p. 343-9.
19. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran, *Marginal zone B cells*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 161-96.
20. Murphy, K.M., *Janeway's Immunobiology 8th Ed*. 2012: Garland Science.p.388
21. Depoil, D., et al., *Early events of B cell activation by antigen*. Sci Signal, 2009. **2**(63): p. pt1.
22. Kalled, S.L., C. Ambrose, and Y.M. Hsu, *The biochemistry and biology of BAFF, APRIL and their receptors*. Curr Dir Autoimmun, 2005. **8**: p. 206-42.
23. Reif, K., et al., *Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position*. Nature, 2002. **416**(6876): p. 94-9.
24. Pape, K.A., et al., *Visualization of the genesis and fate of isotype-switched B cells during a primary immune response*. J Exp Med, 2003. **197**(12): p. 1677-87.
25. Feuillard, J., et al., *Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching*. Int Immunol, 1995. **7**(1): p. 121-30.
26. Liu, Y.J., et al., *Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens*. Eur J Immunol, 1991. **21**(12): p. 2951-62.
27. MacLennan, I.C., *Germinal centers*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 117-39.
28. Berek, C., A. Berger, and M. Apel, *Maturation of the immune response in germinal centers*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1121-9.
29. Shapiro-Shelef, M. and K. Calame, *Regulation of plasma-cell development*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 230-42.
30. Belnoue, E., et al., *APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2755-64.
31. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 45-56.

32. Fairfax, K.A., et al., *Plasma cell development: from B-cell subsets to long-term survival niches*. Semin Immunol, 2008. **20**(1): p. 49-58.
33. Liu, Y.J., et al., *Memory B cells from human tonsils colonize mucosal epithelium and directly present antigen to T cells by rapid up-regulation of B7-1 and B7-2*. Immunity, 1995. **2**(3): p. 239-48.
34. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Human B cell memory*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(3): p. 298-304.
35. Wrammert, J., et al., *Rapid cloning of high-affinity human monoclonal antibodies against influenza virus*. Nature, 2008. **453**(7195): p. 667-71.
36. Paramithiotis, E. and M.D. Cooper, *Memory B lymphocytes migrate to bone marrow in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(1): p. 208-12.
37. Mamani-Matsuda, M., et al., *The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4653-9.
38. Scholz, J.L., et al., *BLyS inhibition eliminates primary B cells but leaves natural and acquired humoral immunity intact*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15517-22.
39. Benson, M.J., et al., *Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL*. J Immunol, 2008. **180**(6): p. 3655-9.
40. Macallan, D.C., et al., *B-cell kinetics in humans: rapid turnover of peripheral blood memory cells*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3633-40.
41. Bernasconi, N.L., E. Traggiai, and A. Lanzavecchia, *Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2199-202.
42. Smith, K.G., et al., *The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci*. Eur J Immunol, 1996. **26**(2): p. 444-8.
43. Tedder, T.F., L.J. Zhou, and P. Engel, *The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes*. Immunol Today, 1994. **15**(9): p. 437-42.
44. Allman, D. and S. Pillai, *Peripheral B cell subsets*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(2): p. 149-57.
45. Ratcliffe, M.J., *The ontogeny and cloning of B cells in the bursa of Fabricius*. Immunol Today, 1985. **6**(7): p. 223-7.
46. Weinstein, P.D., R.G. Mage, and A.O. Anderson, *The appendix functions as a mammalian bursal equivalent in the developing rabbit*. Adv Exp Med Biol, 1994. **355**: p. 249-53.

47. Weinstein, P.D., A.O. Anderson, and R.G. Mage, *Rabbit IgH sequences in appendix germinal centers: VH diversification by gene conversion-like and hypermutation mechanisms*. Immunity, 1994. **1**(8): p. 647-59.
48. Reynaud, C.A., et al., *Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches*. Cell, 1991. **64**(5): p. 995-1005.
49. Parng, C.L., et al., *Gene conversion contributes to Ig light chain diversity in cattle*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5478-86.
50. Butler, J.E., et al., *Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 119-30.
51. Butler, J.E. and M. Sinkora, *The enigma of the lower gut-associated lymphoid tissue (GALT)*. J Leukoc Biol, 2013. **94**(2): p. 259-70.
52. Oláh, I., N. Nagy, and L. Vervelde, *Chapter 2 - Structure of the Avian Lymphoid System A2 - Schat, Karel A*, in *Avian Immunology (Second Edition)*, B. Kaspers and P. Kaiser, Editors. 2014, Academic Press: Boston. p. 11-44.
53. Schaffner, T., et al., *The bursa of Fabricius: a central organ providing for contact between the lymphoid system and intestinal content*. Cell Immunol, 1974. **13**(2): p. 304-12.
54. Reynaud, C.A., et al., *Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo*. Embo j, 1992. **11**(12): p. 4349-58.
55. Härtle, S., *Etablierung funktionell genomischer Techniken zur Untersuchung von Entwicklung und Funktion des aviären Immunsystems mit besonderem Fokus auf dem B-Zellsystem des Huhnes*. 2012, Ludwig-Maximilians-Universität. p. 9-10.
56. Reynaud, C.A., et al., *A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity*. Cell, 1985. **40**(2): p. 283-91.
57. Reynaud, C.A., V. Anquez, and J.C. Weill, *The chicken D locus and its contribution to the immunoglobulin heavy chain repertoire*. Eur J Immunol, 1991. **21**(11): p. 2661-70.
58. Houssaint, E., M. Belo, and N.M. Le Douarin, *Investigations on cell lineage and tissue interactions in the developing bursa of Fabricius through interspecific chimeras*. Dev Biol, 1976. **53**(2): p. 250-64.
59. McCormack, W.T., et al., *Selection for B cells with productive IgL gene rearrangements occurs in the bursa of Fabricius during chicken embryonic development*. Genes Dev, 1989. **3**(6): p. 838-47.
60. Houssaint, E., A. Torano, and J. Ivanyi, *Ontogenic restriction of colonization of the bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1983. **13**(7): p. 590-5.

61. McCormack, W.T., L.W. Tjoelker, and C.B. Thompson, *Avian B-cell development: generation of an immunoglobulin repertoire by gene conversion*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 219-41.
62. Reynaud, C.A., et al., *Formation of the chicken B-cell repertoire: ontogenesis, regulation of Ig gene rearrangement, and diversification by gene conversion*. Adv Immunol, 1994. **57**: p. 353-78.
63. Reynaud, C.A., et al., *A hyperconversion mechanism generates the chicken light chain preimmune repertoire*. Cell, 1987. **48**(3): p. 379-88.
64. Lassila, O., *Emigration of B cells from chicken bursa of Fabricius*. Eur J Immunol, 1989. **19**(5): p. 955-8.
65. Paramithiotis, E., K.A. Jacobsen, and M.J. Ratcliffe, *Loss of surface immunoglobulin expression precedes B cell death by apoptosis in the bursa of Fabricius*. J Exp Med, 1995. **181**(1): p. 105-13.
66. Schusser, B., et al., *Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens*. Eur J Immunol, 2016. **46**(9): p. 2137-48.
67. Schusser, B., et al., *Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20170-5.
68. Kohonen, P., K.P. Nera, and O. Lassila, *Avian model for B-cell immunology--new genomes and phylotranscriptomics*. Scand J Immunol, 2007. **66**(2-3): p. 113-21.
69. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Bursa-dependent subpopulations of peripheral B lymphocytes in chicken blood*. Eur J Immunol, 1993. **23**(1): p. 96-102.
70. Paramithiotis, E. and M.J. Ratcliffe, *Survivors of bursal B cell production and emigration*. Poult Sci, 1994. **73**(7): p. 991-7.
71. Toivanen, P. and A. Toivanen, *Bursal and postbursal stem cells in chicken. Functional characteristics*. Eur J Immunol, 1973. **3**(9): p. 585-95.
72. John, J.L., *The avian spleen: a neglected organ*. Q Rev Biol, 1994. **69**(3): p. 327-51.
73. Nagy, N., et al., *Peripheral blood fibrocytes contribute to the formation of the avian spleen*. Dev Dyn, 2005. **232**(1): p. 55-66.
74. Yasuda, M., et al., *A comparative study of germinal center: fowls and mammals*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1998. **21**(3): p. 179-89.
75. Vainio, O. and A. Toivanen, *Early ontogeny of germinal centre formation in the chicken*. Folia Biol (Praha), 1977. **23**(6): p. 378-9.

76. Romppanen, T., *A morphometrical method for analyzing germinal centers in the chicken spleen*. Acta Pathol Microbiol Scand C, 1981. **89**(4): p. 263-8.
77. Arakawa, H., et al., *Immunoglobulin gene hyperconversion ongoing in chicken splenic germinal centers*. Embo j, 1996. **15**(10): p. 2540-6.
78. Arakawa, H., et al., *Oligoclonal development of B cells bearing discrete Ig chains in chicken single germinal centers*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4232-41.
79. Yasuda, M., et al., *Immunobiology of chicken germinal center: I. Changes in surface Ig class expression in the chicken splenic germinal center after antigenic stimulation*. Dev Comp Immunol, 2003. **27**(2): p. 159-66.
80. Warr, G.W., K.E. Magor, and D.A. Higgins, *IgY: clues to the origins of modern antibodies*. Immunol Today, 1995. **16**(8): p. 392-8.
81. Jeurissen, S.H., *The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response*. Immunology, 1993. **80**(1): p. 29-33.
82. Spets, H., et al., *Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival*. Eur J Haematol, 2002. **69**(2): p. 76-89.
83. Randall, T.D., et al., *Interleukin-5 (IL-5) and IL-6 define two molecularly distinct pathways of B-cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(7): p. 3929-36.
84. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 448-57.
85. Takatsu, K., et al., *T cell-replacing factor (TRF)/interleukin 5 (IL-5): molecular and functional properties*. Immunol Rev, 1988. **102**: p. 107-35.
86. Hillier, L.W., et al, *Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution*. Nature, 2004. **432**(7018): p. 695-716.
87. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
88. De Togni, P., et al., *Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin*. Science, 1994. **264**(5159): p. 703-7.
89. Allen, R.C., et al., *CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome*. Science, 1993. **259**(5097): p. 990-993.
90. Banchereau, J., et al., *Functional CD40 antigen on B cells, dendritic cells and fibroblasts*. Adv Exp Med Biol, 1995. **378**: p. 79-83.

91. Gardell, J.L. and D.C. Parker, *CD40L is transferred to antigen-presenting B cells during delivery of T-cell help*. Eur J Immunol, 2017. **47**(1): p. 41-50.
92. Laman, J.D., et al., *CD40-CD40L interactions in atherosclerosis*. Immunol Today, 1997. **18**(6): p. 272-7.
93. Carbone, E., et al., *A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2053-60.
94. Elzey, B.D., et al., *Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments*. Immunity, 2003. **19**(1): p. 9-19.
95. Bishop, G.A. and B.S. Hostager, *The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 297-309.
96. Carrasco, Y.R., et al., *LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation*. Immunity, 2004. **20**(5): p. 589-99.
97. Collins, M., V. Ling, and B.M. Carreno, *The B7 family of immune-regulatory ligands*. Genome Biol, 2005. **6**(6): p. 223.
98. Clatza, A., et al., *CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation*. J Immunol, 2003. **171**(12): p. 6478-87.
99. Carey, G.B., et al., *B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death*. Immunol Rev, 2000. **176**: p. 105-15.
100. Tregaskes, C.A., et al., *Conservation of biological properties of the CD40 ligand, CD154 in a non-mammalian vertebrate*. Dev Comp Immunol, 2005. **29**(4): p. 361-74.
101. Kothlow, S., et al., *CD40 ligand supports the long-term maintenance and differentiation of chicken B cells in culture*. Dev Comp Immunol, 2008. **32**(9): p. 1015-26.
102. Schumacher, M., *Untersuchungen zum Einfluss der Zytokine CD40L, IL-6 und IL-10 auf die terminale Differenzierung der B-Lymphozyten des Haushuhns*. 2009.
103. Moore, P.A., et al., *BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator*. Science, 1999. **285**(5425): p. 260-3.
104. Schneider, P., et al., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1747-56.
105. Waldschmidt, T.J. and R.J. Noelle, *Immunology. Long live the mature B cell--a baffling mystery resolved*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2012-3.

106. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
107. Gross, J.A., et al., *TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 995-9.
108. Groom, J., et al., *Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome*. J Clin Invest, 2002. **109**(1): p. 59-68.
109. Mariette, X., et al., *The level of BLyS (BAFF) correlates with the titre of autoantibodies in human Sjogren's syndrome*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(2): p. 168-71.
110. Bossen, C., et al., *Mutation of the BAFF furin cleavage site impairs B-cell homeostasis and antibody responses*. Eur J Immunol, 2011. **41**(3): p. 787-97.
111. Gorelik, L., et al., *Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells*. J Exp Med, 2003. **198**(6): p. 937-45.
112. Mackay, F., et al., *BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 231-64.
113. Scapini, P., et al., *Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases*. Blood, 2005. **105**(2): p. 830-7.
114. Chu, V.T., et al., *Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow*. Nat Immunol, 2011. **12**(2): p. 151-9.
115. Ettinger, R., et al., *IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2872-82.
116. Qian, Y., et al., *Act1, a negative regulator in CD40- and BAFF-mediated B cell survival*. Immunity, 2004. **21**(4): p. 575-87.
117. Lin-Lee, Y.C., et al., *Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes*. J Biol Chem, 2006. **281**(27): p. 18878-87.
118. Karnell, J.L. and R. Ettinger, *The Interplay of IL-21 and BAFF in the Formation and Maintenance of Human B Cell Memory*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 2.
119. Schneider, K., et al., *Chicken BAFF--a highly conserved cytokine that mediates B cell survival*. Int Immunol, 2004. **16**(1): p. 139-48.
120. Koskela, K., et al., *Chicken B-cell-activating factor: regulator of B-cell survival in the bursa of fabricius*. Scand J Immunol, 2004. **59**(5): p. 449-57.

121. Koskela, K., et al., *Insight into lymphoid development by gene expression profiling of avian B cells*. Immunogenetics, 2003. **55**(6): p. 412-22.
122. Kothlow, S., et al., *Unique and conserved functions of B cell-activating factor of the TNF family (BAFF) in the chicken*. Int Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-15.
123. Kothlow, S., et al., *Prolonged effect of BAFF on chicken B cell development revealed by RCAS retroviral gene transfer in vivo*. Molecular Immunology, 2010. **47**(7-8): p. 1619-1628.
124. Commins, S., J.W. Steinke, and L. Borish, *The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(5): p. 1108-11.
125. O'Garra, A. and P. Vieira, *Regulatory T cells and mechanisms of immune system control*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 801-5.
126. Clarke, C.J., et al., *IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1719-26.
127. Brown, C.Y., et al., *Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin-10*. J Biol Chem, 1996. **271**(33): p. 20108-12.
128. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
129. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
130. O'Garra, A., et al., *Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10*. Eur J Immunol, 1992. **22**(3): p. 711-7.
131. Edwards, A.D., et al., *Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering*. J Immunol, 2002. **169**(7): p. 3652-60.
132. Boonstra, A., et al., *Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals*. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7551-8.
133. Saeland, S., et al., *Human B cell precursors proliferate and express CD23 after CD40 ligation*. J Exp Med, 1993. **178**(1): p. 113-20.
134. Fluckiger, A.C., et al., *Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes*. J Exp Med, 1993. **178**(5): p. 1473-81.

135. Itoh, K. and S. Hirohata, *The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation*. J Immunol, 1995. **154**(9): p. 4341-50.
136. Levy, Y. and J.C. Brouet, *Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein*. J Clin Invest, 1994. **93**(1): p. 424-8.
137. Hu, B.T. and R.A. Insel, *Up-regulation of telomerase in human B lymphocytes occurs independently of cellular proliferation and with expression of the telomerase catalytic subunit*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3745-53.
138. Armitage, R.J., et al., *Human B cell proliferation and Ig secretion induced by recombinant CD40 ligand are modulated by soluble cytokines*. J Immunol, 1993. **150**(9): p. 3671-80.
139. Rousset, F., et al., *Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1890-3.
140. Defrance, T., et al., *Interleukin 10 and transforming growth factor beta cooperate to induce anti-CD40-activated naive human B cells to secrete immunoglobulin A*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 671-82.
141. Arpin, C., et al., *Generation of memory B cells and plasma cells in vitro*. Science, 1995. **268**(5211): p. 720-2.
142. Rothwell, L., et al., *Cloning and characterization of chicken IL-10 and its role in the immune response to Eimeria maxima*. J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2675-82.
143. Wu, Z., et al., *Analysis of the function of IL-10 in chickens using specific neutralising antibodies and a sensitive capture ELISA*. Developmental & Comparative Immunology, 2016.
144. Parrish-Novak, J., et al., *Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 57-63.
145. Ozaki, K., et al., *Cloning of a type I cytokine receptor most related to the IL-2 receptor beta chain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(21): p. 11439-44.
146. Tangye, S.G., *Advances in IL-21 biology - enhancing our understanding of human disease*. Curr Opin Immunol, 2015. **34**: p. 107-15.
147. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(5): p. 379-95.
148. Bryant, V.L., et al., *Cytokine-mediated regulation of human B cell differentiation into Ig-secreting cells: predominant role of IL-21 produced by CXCR5+ T follicular helper cells*. J Immunol, 2007. **179**(12): p. 8180-90.
149. Chtanova, T., et al., *T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile*,

- reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol*, 2004. **173**(1): p. 68-78.
150. Pene, J., et al., *Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells*. *J Immunol*, 2004. **172**(9): p. 5154-7.
151. Ettinger, R., et al., *IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 7867-79.
152. Avery, D.T., et al., *IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4*. *J Immunol*, 2008. **181**(3): p. 1767-79.
153. Konforte, D., N. Simard, and C.J. Paige, *IL-21: an executor of B cell fate*. *J Immunol*, 2009. **182**(4): p. 1781-7.
154. Rahe, M.C. and M.P. Murtaugh, *Interleukin-21 Drives Proliferation and Differentiation of Porcine Memory B Cells into Antibody Secreting Cells*. *PLoS One*, 2017. **12**(1): p. e0171171.
155. Ding, B.B., et al., *IL-21 and CD40L synergistically promote plasma cell differentiation through upregulation of Blimp-1 in human B cells*. *J Immunol*, 2013. **190**(4): p. 1827-36.
156. Diehl, S.A., et al., *STAT3-mediated up-regulation of BLIMP1 Is coordinated with BCL6 down-regulation to control human plasma cell differentiation*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4805-15.
157. Zotos, D., et al., *IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 365-78.
158. Linterman, M.A., et al., *IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses*. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 353-63.
159. Attridge, K., et al., *IL-21 promotes CD4 T cell responses by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent upregulation of CD86 on B cells*. *J Immunol*, 2014. **192**(5): p. 2195-201.
160. Rodriguez-Bayona, B., et al., *Cutting edge: IL-21 derived from human follicular helper T cells acts as a survival factor for secondary lymphoid organ, but not for bone marrow, plasma cells*. *J Immunol*, 2012. **188**(4): p. 1578-81.
161. Stephanou, A. and D.S. Latchman, *Opposing actions of STAT-1 and STAT-3*. *Growth Factors*, 2005. **23**(3): p. 177-82.
162. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
163. Ettinger, R., S. Kuchen, and P.E. Lipsky, *The role of IL-21 in regulating B-cell function in health and disease*. *Immunol Rev*, 2008. **223**: p. 60-86.

164. Mehta, D.S., et al., *IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4111-8.
165. Hagn, M., et al., *Human B cells differentiate into granzyme B-secreting cytotoxic B lymphocytes upon incomplete T-cell help*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(4): p. 457-67.
166. Rothwell, L., et al., *Chicken interleukin-21 is costimulatory for T cells and blocks maturation of dendritic cells*. Dev Comp Immunol, 2012. **36**(2): p. 475-82.
167. Graham, F.L., et al., *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J Gen Virol, 1977. **36**(1): p. 59-74.
168. Morgenroth, I., *Charakterisierung des CD40-CD40L-Systems als wichtiger Regulator der B-Zellfunktion des Haushuhns*. 2007.
169. Busalt, F., *Untersuchungen zur Rolle von CXCR4 und CXCR5 in der B-Zell-Entwicklung beim Huhn*. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät in Tierärztliche Fakultät. 2013, Ludwig-Maximilian-Universität.
170. Jacobsen, K.A., et al., *Apoptotic cell death in the chicken bursa of Fabricius*. Adv Exp Med Biol, 1996. **406**: p. 155-65.
171. Russell, W.M.S. and R.L. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959.
172. Fecteau, J.F. and S. Neron, *CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4621-9.
173. Rothwell, C.J., L. Vervelde, and T.F. Davison, *Identification of chicken Bu-1 alloantigens using the monoclonal antibody AV20*. Vet Immunol Immunopathol, 1996. **55**(1-3): p. 225-34.
174. Houssaint, E., E. Diez, and J.R. Pink, *Ontogeny and tissue distribution of the chicken Bu-1a antigen*. Immunology, 1987. **62**(3): p. 463-70.
175. Chen, C.H., et al., *Production and characterization of agonistic monoclonal antibodies against chicken CD40*. Dev Comp Immunol, 2010. **34**(11): p. 1139-43.
176. Takamatsu, H., et al., *Establishment of long-term CD154-dependent porcine B-cell cultures*. Immunology, 1999. **97**(2): p. 211-8.
177. Bhatia, S., et al., *B7-1 and B7-2: similar costimulatory ligands with different biochemical, oligomeric and signaling properties*. Immunol Lett, 2006. **104**(1-2): p. 70-5.
178. Pentcheva-Hoang, T., et al., *B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse*. Immunity, 2004. **21**(3): p. 401-13.

-
179. Ceradini, D.J., et al., *Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 858-64.
 180. O'Connor, B.P., et al., *BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells*. J Exp Med, 2004. **199**(1): p. 91-8.
 181. Brandes, M., et al., *Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines*. Int Immunol, 2000. **12**(9): p. 1285-92.
 182. Medina, F., et al., *The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression*. Blood, 2002. **99**(6): p. 2154-61.
 183. Schattner, E.J., et al., *CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1557-65.
 184. Tumang, J.R., et al., *BCR engagement induces Fas resistance in primary B cells in the absence of functional Bruton's tyrosine kinase*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 2712-9.

10 ANHANG

A Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Die Bezugsquellen wurden als Hochzahlen entsprechend nachfolgender Tabelle in Kapitel 4 (Material und Methoden) integriert:

1. Applichem, Darmstadt
2. Biochrom, Berlin
3. Brand, Wertheim
4. Rotexmedica, Tritttau
5. Invitrogen GmbH, Karlsruhe
6. Amicon Corporation, Witten
7. Sigma, Deisenhofen
8. freundlicherweise von Dr. J. Young, Institute of Animal Health, Compton/UK zur Verfügung gestellt
9. Southern Biotechnologies, Birmingham/USA
10. AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf
11. Amersham/GE Healthcare, München
12. Sigma Aldrich, Saint Louis, USA
13. Linaris, Wertheim
14. Merck, Darmstadt
15. eBioscience, Frankfurt
16. Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim
17. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld
18. Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
19. Sarstedt, Nümbrecht
20. Henry Schein, Berlin

-
21. ThermoFisher Scientific, Waltham, USA
 22. Promega GmbH. Mannheim
 23. Roth, Karlsruhe
 24. PerkinEmer, Waltham, Massachusetts, USA
 25. Biolegend, Fell
 26. Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., New Market/UK

B. Laborgeräte in alphabetischer Reihenfolge

Gerät	Bezeichnung	Herstellerfirma
Analysewaage	Mettler PJ400	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Amiconrührzelle	UFSC40001, Rührzelle, Modell 8400, 400 ml	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Beta-Counter	Topcount NXT Scintillation Counter	Packard, USA
Brüter (Stall)	BSS 200/8203	Grumbach Brutgeräte GmbH, Asslar
Brutschrank	CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Instruments, München
Brutschrank für die Zellkultur	MCO-5AC	Sanyo, München
Chromatographie-Anlage	Bio-Rad BiolLogic LP mit Model2100 Fraction Collector	Bio-Rad, München
Dampfsterilisator	Varioklav Typ 500E	Thermo Scientific, München
Durchflusszytometer	FACSCantoII	Becton Dickinson, Heidelberg
ELISA-Washer	Tecan M8/4R Columbus plus	SLT Labinstruments, Crailsheim
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100	Scotsman Ice Systems, Mailand, Italien
Hybridisierungssofen	G2545A	Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius/USA
Magnetrührer	IKAMAG®RCT	IKA®Werke GmbH + Co.KG, Staufen
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Jena
Mikroskop	Leica DMIL Kamera DF340XF	Leica, Bensheim
Mikrozentrifuge	5415R	Eppendorf AG, Hamburg
pH-Meter	Sartorius PB-11 mit Glaselektrode PY-P10	
Platten-Photometer	Sunrise-Remote	Tecan, Crailsheim
Schüttler	Kombischüttler KL-2	Johanna-Otto GmbH, Hechingen
Sicherheitswerkbank	Mikroflow	Nunc, Wiesbaden
Stickstofftank	Locator 6 Plus	Barnstead Thermolyne, Dubuque/USA
Thermoschüttler	TS 1 Thermoshaker	Biometra, Göttingen
Vortex-Mixer	GVLab®	Gilson Inc., Middleton, USA
Wärmeschrank	neoLab Universal Wärmeschrank Basic 39I	neoLab Migge Laborbedards-Gm
Wasserbad	GFL1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zählkammer	Modifizierte Zählkammer nach Neubauer	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Sigma 4K15C	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge	Centrifuge 5810	Eppendorf, Köln

11 DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernd Kaspers für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz Dr. Sonja Härtle für die Überlassung des Dissertationsthemas und ihre große Leidenschaft für die B-Zellen des Huhns.

Für die große technische Hilfsbereitschaft möchte ich mich ganz herzlich bei Marina Kohn und Beatrice Schaerer und bedanken. Besonders wegen deiner angenehmen Art Beatrice habe ich mich im ELISA Labor stets zu Hause gefühlt. Bei Marina bedanke ich mich herzlichst für unsere guten Absprachen bezüglich der Organpräparationen.

Herzlichen Dank an die gesamte AG Göbel, für die gute Zusammenarbeit am Institut und die enge wissenschaftliche Kooperation.

Für die Betreuung der Hühner danke ich Herrn Fritz Meggendorfer, Daniela Hölle, Andreas Schöffmann und Thomas Hoschka. Vielen Dank auch an die Rechnerbetriebsgruppe, besonders an Gerhard Moll.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle meine Mitdoktoranden Anke Staudt, Bernhard Mutze Dorothea Aumann, Sarah Lettmann und Maria Laparidou und unsere Postdoc Dr. Susanne Röhl, die mich in einer besonderen Zeit begleitet und aufgemuntert haben. Dies war weitaus mehr als ich von Arbeitskollegen erwartet hätte.

Für die finale Rechtschreibkorrektur bedanke ich mich außerordentlich bei Gêrnôt Schoch und Lisa Fenzl.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Fabian für die partnerschaftliche Unterstützung, den mentalen, emotionalen und sportlichen Ausgleich zur Arbeit.

Unendlich dankbar bin ich meinen Eltern, ohne die mein Tiermedizinstudium gar nicht möglich gewesen wäre.